

Statistische Untersuchungen
zur Wirkung von Tuberkulinlösungen
auf sensibilisierte Zellen des Menschen

von

GERHARD STEINIG

Aus der Heilstätte Donaustauf
der Landesversicherungsanstalt Niederbayern-Oberpfalz
(Chefarzt: O.Med.Rat Dr.med. Fr.J.Bassermann)

STATISTISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR WIRKUNG VON TUBERKULIN-
LÖSUNGEN AUF SENSIBILISIERTE ZELLEN DES MENSCHEN.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Gerhard S t e i n i g

aus

Ergolding/Ndb.



M ü n c h e n 1960

5349/60

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referent : .. Prof. Dr. H. E y e r
Dekan : .. Prof. Dr. H. S c h w i e g k

Tag der mündlichen Prüfung: 23.2.1960

Statistische Untersuchungen zur Wirkung von Tuberkulin -
Lösungen auf sensibilisierte Zellen des Menschen.

Gliederung:

	Seite:
1. Einleitung	1 - 3
2. Historische und methodologische Übersicht	3 - 18
3. Problemstellung	18 - 19
4. Vorversuche, Beobachtungen und Dis- kussion technischer Probleme	19 - 27
5. Versuchsanordnung	27 - 30
6. Versuchsergebnisse und Diskussion	30 - 46
7. Schlußfolgerungen	46 - 47
8. Zusammenfassung	47 - 48
9. Literaturnachweis	50 - 56



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. Einleitung

In der kaum mehr übersehbaren Literatur zum Problem der Allergie und Immunität der Tuberkulose nehmen exakte wissenschaftliche Untersuchungen, aber auch spekulative Hypothesen breiten Raum ein.

Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich mit dem Phaenomen der Tuberkulinhautempfindlichkeit als eine der am häufigsten zu beobachtenden, aber auch problemreichsten allergischen Reaktion im tuberkuloseinfizierten Organismus. Da es bisher noch nicht möglich war, die vielfältigen Beobachtungen und Hypothesen einer allseitig anerkannten Lehre einzuordnen, wird von vielen Autoren noch immer von einer Sonderstellung der Tuberkulose unter den Infektionskrankheiten gesprochen.

Experimentelle und klinische Beobachtungen der letzten Jahre lassen jedoch erkennen, " daß Allergie und Immunologie der Tuberkulose sehr vieles gemeinsam haben mit entsprechenden Manifestationen bei gewissen anderen Infektionskrankheiten, so daß es wenig gerechtfertigt erscheint, die " Sonderstellung " der Tuberkulose hervorzuheben. " (H. B l o c h und E. S u t e r 1958.)

Viele Schwierigkeiten bei der Besprechung dieser Probleme ergeben sich leider aus oftmals divergierenden Begriffsdefinitionen, weil selbst innerhalb eines Sprachraumes Begriffe wie " Immunität ", " Resistenz", " Allergie " usw. von den einzelnen Autoren in verschiedenem Sinne verwendet und gedeutet werden. Schon dadurch ist, zusammen mit widerspruchsvollen, historisch verankerten Darstellungen, eine gemeinsame Konzeption über die Beziehungen der Allergie und der Immunitätsvorgänge bei der Tuberkulose äußerst erschwert. Es ist daher notwendig, in der Einleitung zu dieser Arbeit, die häufigsten Begriffe so zu definieren, wie sie verstanden und verwendet werden sollen.

Als " natürliche Resistenz " bezeichnen wir mit

F. S c h m i d (1958) " eine unspezifische, genotypisch verankerte, alters -, geschlechts -, konstitutions -, rasse - und speziesgebundene biologische Eigenschaft, die in ihrem Grundniveau zwar ererbt ist, aber keine, für das ganze menschliche Leben, konstante Wertigkeit besitzt. " " Immunität " definieren wir entsprechend den Verhandlungen der Internationalen Tuberkulosekonferenz in Rio de Janeiro 1952, zitiert n. H.G. F a s s o e n d e r (1958), als " die erworbene spezifische Resistenz, welche durch die Erstinfektion hervorgebracht wird." Sie ist somit eine erworbene Fähigkeit und gehört unlösbar zur Allergie. Damit ist zugleich auch der Begriff der " erworbenen Resistenz " klar bezeichnet. Er stellt einen Zustand einer, gegenüber der Norm erhöhten Resistenz dar, den ein Organismus durch vorangegangene, subklinisch verlaufene Primärinfektion oder Vakzination erworben hat und ist gleichbedeutend mit Immunität. (H. B l o c h und E. S u t e r 1958)

Für den qualitativ und zeitlich andersartigen Ablauf der Serum - und Impfreaktionen bei entsprechend vorbehandelten Personen prägte Cl. v. P i r q u e t (1906) den Begriff der " Allergie ". Ihm fehlt in seiner originalen Definition die ausdrückliche Betonung eines spezifischen Charakters, so daß er in seiner ursprünglichen Fassung zu weit und unscharf erscheint. Durch E.R. R ö s s l e (1932) erfuhr er darum eine konkretere Fassung, wonach die Allergie " in einer klinisch oder anatomisch nachweisbaren Änderung der Reaktionsfähigkeit auf die wiederholte Einführung ein und derselben körperfremden Stoffart " besteht.

Als " Tuberkulose - Allergie " bezeichnen wir deshalb die Eigenschaft eines mit Tuberkelbakterien infizierten oder in geeigneter Weise sensibilisierten Organismus, auf parenterale Zweitzufuhr von Tuberkelbakterien oder bakterienfreien Extrakten der Tuberkelbakterien andersartig zu reagieren.

Diese spezifische Allergie umfaßt alle von der Norm abweichenden Reaktionen, also auch die Hyperergie, die Hyp (o) ergie und die spezifische Anergie. Demgemäß ist es nicht gerechtfertigt, den im anglo-amerikanischen Schrifttum angewendeten Ausdruck der " Überempfindlichkeit " (= hypersensitiveness) für " Allergie " generell gleichzusetzen, da er nur eine Begriffseinschränkung auf die allerdings häufigste Ausdrucksform der Allergie darstellt.

Die so zu Verwechslungen führenden Ungenauigkeiten im Sprachgebrauch hat H.G. F a ß b e n d e r (1958) in zwei Punkten zusammengefaßt:

- 1) Gleichsetzung von Allergie mit allergischer Reaktion.
- 2) Gleichsetzung von Allergie mit Hyperergie und somit auch mit hyperergischer Reaktion.

Es war das große Verdienst von v. P i r q u e t die von ihm als Allergie bezeichnete Reaktionsänderung des sensibilisierten Organismus mit der Bildung von Antikörpern in Verbindung gebracht zu haben. So ist auch heute noch Kernpunkt jeder echten Allergie und Unterscheidungsmerkmal gegenüber den auf unspezifischen Mechanismen beruhenden erworbenen, krankhaft gesteigerten oder verminderten Reizbeantwortungen die Fähigkeit des Organismus, auf die Zufuhr eines Antigen mit der Produktion eines Anti - körpers zu antworten.

2. Historische und methodologische Übersicht.

Bereits R. K o c h (1891) beschrieb in dem nach ihm benannten " Grundversuch ", wie in einem tuberkulös infizierten Organismus eine Zweitinfektion wesentlich anders verläuft als eine ähnliche Infektion in einem vor dem nicht infizierten Tier. Versuchstiere, die mit Tuberkelbakterien infiziert waren, zeigten auf eine erneute Einspritzung mit lebenden und abgetöteten Tuberkelbakterien nicht, wie bei der Erstinfektion, einen von der Injektionsstelle ausgehenden, fortschreitenden spezifischen Krankheitsverlauf, sondern reagierten mit lokaler Nekrose, Sequestration und Geschwürsbildung. Der Prozeß blieb lokalisiert, heilte schnell und dauernd aus,

ohne die benachbarten Lymphknoten zu infizieren.

K o c h interpretierte diese Vorgänge als erworbenen Heilungsmechanismus und konnte einige Jahre später (1899) zeigen, daß die gleichen Gewebsreaktionen, wie sie durch eine Zweitinfektion mit lebenden oder toten Bakterien auftraten, auch bei Injektion eines bakterienfreien Extraktes der Tuberkelbakterien in gleicher Weise in Erscheinung traten.

Das ursprünglich von K o c h für diese Untersuchungen verwendete Präparat war ein in der Hitze hergestellter Glycerinextrakt von Tuberkelbakterienkulturen, der durch Filtration von Bakterien befreit und durch Eindampfen konzentriert wurde. Er enthielt etwa 50% Glycerin und entsprechend seiner Herstellung- sämtliche in Glycerin und Wasser löslichen Bakterienbestandteile sowie die während der Wachstumsperiode der Kultur in der Flüssigkeit angesammelten Stoffwechsel- und Autolyseprodukte der Bakterien. Dieses hitzebeständige Präparat, allgemein als " Alttuberkulin " (AT) bezeichnet, ist heute noch im Gebrauch und hat seine wichtige Stellung in der Tuberkulosedagnostik behalten, obwohl im Laufe der Jahre zahlreiche, auf andere Weise hergestellte Tuberkuline entwickelt wurden.

Zunächst glaubte man, das von den Tuberkelbakterien in die Kulturflüssigkeit abgegebene Toxin vor sich zu haben. Doch dieses " Toxin " verhielt sich ganz anders, als man es von anderen Bakterientoxinen gewöhnt war. Es wurde von gesunden Menschen und Tieren in größten Dosen vertragen. Aber auch ein echtes Antigen konnte Tuberkulin nicht sein, da es bislang nicht möglich war, durch Einverleiben von Tuberkulin in einem gesunden (nicht tuberkuloseinfizierten) Organismus Antikörper hervorzurufen.

Diese Tatsache hatte unter anderem dazu beigetragen, daß man jahrzehntelang die Frage diskutierte, ob die Tuberkulinallergie überhaupt ein echtes allergisches Phaenomen sei. Unterstützt wurden diese Zweifel noch durch andere Argumente, die gegen eine humorale Antigen-Antikörper-Begegnung zu sprechen schienen. So war vor allem eine passive Übertragung der Tuberkulinempfindlichkeit mit Serum nicht möglich. Auch unterschied sich

die lokale Tuberkulinreaktion in ihrem Charakter zeitlich und morphologisch wesentlich von den sonst bekannten anaphylaktischen Hautreaktionen. Ferner zeigte die Tuberkulinzufuhr in höheren Dosen an Stelle des anaphylaktischen Schockes nur eine, als " protrahierten Tuberkulintod " bezeichnete, verzögerte Allgemeinreaktion. In den letzten Jahren haben aber alle Kriterien, die gegen die allergische Natur dieser Vorgänge sprachen, eine Aufklärung erfahren, die in gedrängter Übersicht hier wiedergegeben werden soll.

Schon 1910 beobachtete E.R. B a l d w i n , daß es möglich war, mit tuberkulinartigen Präparaten Tiere anaphylaktisch zu machen. Eine charakteristische Tuberkulinempfindlichkeit ließ sich jedoch nur mit intakten Tuberkelbakterien hervorrufen. Dieses Ergebnis konnte H. Z i n s s e r (1921) bestätigen. Er unterschied erstmalig zwischen zwei verschiedenen Typen allergischer Reaktionen, die durch Tuberkulin ausgelöst werden können. Einerseits beobachtete er eine anaphylaktische Reaktion bei gesunden, mit Tuberkuloproteinen sensibilisierten und tuberkulösen Tieren, die wenige Minuten bis Stunden nach intrakutaner Injektion eines Tuberkuloprotein auftrat. Diese war im Schultz-Dale-Versuch nachweisbar und konnte passiv übertragen werden. Andererseits beschrieb er eine verzögert ablaufende Gewebereaktion, die nicht vor Ablauf von 8, gewöhnlich aber erst nach 24 Stunden auftrat und nur nach einer akuten Infektion mit Tuberkelbakterien oder Verimpfung von abgetöteten Bakterien ausgelöst wurde. Diese Tuberkulinempfindlichkeit war passiv nicht übertragbar.

Seither erhielt die Hautreaktion vom Tuberkulintyp eine Sonderstellung gegenüber dem Arthrustyp der allergisch-hyperergischen Entzündung. Ihrem Verhalten nach werden im angelsächsischen Schrifttum für die anaphylaktische Reaktion die Bezeichnungen " immediate reaction ", für die **verzögert** ablaufende Reaktion vom Tuberkulintyp

" delayed reaction " oder " tuberculin type reaction " verwendet.

Spätere Arbeiten von L. D i e n e s und E.W. S c h o e n h e i t (1927) und J.H. H a n k s (1935) führten zu der Erkenntnis, daß zur Erzeugung von Tuberkulinempfindlichkeit der Haut intakte tote oder lebende Tuberkelbakterien notwendig sind. Aber auch beim Vorliegen tuberkulöser Läsionen (Tuberkeln) sind fremde Eiweißarten, die im normalen Tier lediglich anaphylaktische Reaktionen hervorrufen, befähigt, allergische Reaktionen vom Tuberkulintyp auszulösen. Daraus war zu schließen, daß die veränderte Reaktionsweise durch die Anwesenheit von Tuberkelbakterien bestimmt wurde, in deren Gegenwart das artfremde Eiweiß die beschriebene Eigenschaft annahm.

Durch derartige Beobachtungen angeregt, haben sich viele Untersucher mit der Frage nach dem Wesen der wirksamen Substanz im Tuberkulin befaßt. Vor allem waren es die Arbeiten von F.B. S e i b e r t und ihrem Arbeitskreis, welche sich über viele Jahre mit dem Problem der wirksamen Bestandteile des Tuberkulin an Hand experimenteller und analytischer Untersuchungen auseinandersetzten.

S e i b e r t gelang es durch fraktionierte Fällung mit Alkohol bei tiefer Temperatur aus nicht erhitzten Kulturfiltraten drei verschiedene Eiweißkörper (Protein A, B und C) zu isolieren, daneben Glykogen, Nukleinsäure und zwei Polysaccharide.

Das Protein A, mit einem Mol.Gew. zwischen 32 000 und 44 000 wird von ihr als die biologisch wirksamste Substanz bezeichnet. Nach F. S c h m i d (1958) soll diese möglicherweise mit einem von S e i b e r t 1932 kristallinisch dargestellten Tuberkuloprotein identisch sein. Andererseits soll sie auch der von P r i g g e dargestellten Tuberkulin - Muttersubstanz entsprechen. (O. R u b n e r und E. B u d d e c k e 1957).

Das Protein A besitzt echte vollantigene Eigenschaften,

ist also imstande zu sensibilisieren.

Protein B und C, wie alle übrigen aus Tuberkelbakterien isolierten und chemisch analysierten Substanzen besitzen nicht die Fähigkeit, den Organismus zur Bildung von Antikörpern anzuregen. Sie sind aber in der Lage, im tuberkulösen Organismus die charakteristischen Hautreaktionen auszulösen.

In Tuberkulinen aus erhitzten Kulturfiltraten, wie sie zu diagnostischen Zwecken Verwendung finden, überwiegen Proteine mit einem Mol.Gewicht von 16 000. Es wird daher angenommen, daß es sich hierbei um Spaltprodukte des Tuberkuloprotein aus unerhitzten Kulturfiltraten handelt, die nicht mehr sensibilisieren können, also ihren Antigencharakter verloren haben. Solche Tuberkuline sind nicht mehr identisch mit dem Bakterieneiweiß, das sonst die Sensibilisierung auslöst. Nur bei Anwesenheit von Antigenen des durch Tuberkelbakterien sensibilisierten Organismus sind sie reaktionsfähig.

Da Tuberkulin einerseits nicht selbständig, wohl aber mit einer Schleppersubstanz sensibilisieren kann, andererseits jedoch die Fähigkeit besitzt, mit vorhandenen Antikörpern zu reagieren, wird es als Hapten oder Halbantigen bezeichnet. (H. K l e i n s c h m i d t 1958)

Diese Feststellung leitet über zu der Frage nach dem Sitz der durch die Tuberkuloseinfektion entstandenen Antikörper.

Da eine passive Übertragung der Tuberkulose - Allergie durch Serum nicht möglich war, mußte einem ersten Hinweis auf die passive Übertragbarkeit mit Hilfe von Zellen durch O. B a i l l (1912) besondere Bedeutung zukommen. Er injizierte gesunden Meerschweinchen intraperitoneal Aufschwemmungen von Organbrei aus Milz oder Leber von tuberkulösen Meerschweinchen. Acht bis zwölf Stunden später waren die Empfänger sensibilisiert und gingen nach intraperitonealen Injektionen von Tuberkulin in typischer Weise an einem protrahierten generalisierten

Tuberkulinschock in 1 - 2 Tagen zugrunde. Seine Veröffentlichung fand jedoch nur wenig Beachtung.

Einige andere Autoren konnten in gleichen Versuchsansätzen wohl diese Beobachtungen bestätigen, doch war keiner in der Lage, daraus bindende Schlüsse zu ziehen (F. Schmid 1958)

Um so größeres Interesse fand die Mitteilung von M.W. C h a s e (1945), dem es gelungen war, die Tuberkulinempfindlichkeit mit Leukocyten von sensibilisierten Meerschweinchen auf gesunde Tiere zu übertragen.

Mehrere Jahre lang hatte er, wie viele andere Untersucher zuvor, die passive Übertragbarkeit mit Hilfe großer Mengen Serum und verschiedenen Organaufbereitungen zu demonstrieren versucht. Dabei stellte er 1942 mit L a n d - s t e i n e r fest, daß sich experimentell erzeugte Arzneimittellergie mittels suspendierter Leukocyten aus Peritonealexsudaten, Lymphknoten oder Milzgewebe passiv auf normale Tiere übertragen ließ. (K. L a n d s t e i n e r und M.W. C h a s e 1942.)

Da die von C h a s e gewählte Versuchsanordnung Grundlage und Ausgangspunkt vieler Nachkontrollen war, soll sie hier eingehender beschrieben werden.

In den Spendertieren hatte er durch Infektion oder durch Injektion von Tuberkelbakterien, die durch Hitze abgetötet waren, Tuberkulinempfindlichkeit erzeugt. Peritonealexsudate, die sich vier Tage nach intraperitonealer Injektion von Leichtmineralöl entwickelt hatten, wurden abpunktiert, sorgfältig gewaschen und auf verschiedene Weise den Empfängertieren zugeführt. Am besten gelang die Übertragung durch intraperitoneale Injektion des Exsudates, das überwiegend Makrophagen, etwa 30% Lymphocyten und eine geringe Anzahl Neutrophiler enthielt. Am Tage nach der Übertragung wurde in üblicher Weise ein Tuberkulinhauttest angelegt. Innerhalb 24 bis 48 Stunden traten lokale Rötung, Induration und sogar vereinzelt lokale Nekrosen auf. Einige Tage nach Erwerb der passiv übertragenen Tuberkulinempfindlichkeit fielen jedoch Kontrollteste wieder negativ aus.

Sehr zahlreiche Autoren konnten in den folgenden Jahren die Ergebnisse von C h a s e mit dem gleichen Zellmaterial

(Peritonealexsudatzellen und Milzgewebe) sowie mit Lymphknotenbrei bestätigen, u.a. M.M. C u m m i n g s und Mitarbeiter (1947), A.B. S t a v i t s k y (1948) M.M. M e t a x a s und Mitarbeiter (1948) F. S c h m i d (1951) und G. H e n s e l (1952). Über erfolgreiche Tierversuche mit Liquorzellen berichtete F. S c h m i d (1951). Schließlich gelangen auch analoge Versuche am Menschen. So konnte H.S. L a w r e n c e (1949) Tuberkulinempfindlichkeit mittels Blutleukocyten von tuberkulin - positiven Versuchspersonen auf tuberkulin - negative Empfänger übertragen. A.B. S t a v i t s k y (1948) erreichte dasselbe durch massive Bluttransfusionen. H. S c h l a n g e (1954) berichtete in Übereinstimmung mit S t a v i t s k y über die Möglichkeit der passiven Übertragung der Tuberkulinhautempfindlichkeit durch große Blutaustauschtransfusionen bei Säuglingen und (1955) über die Übertragbarkeit von sensibilisierten Kindern auf Meerschweinchen durch Cantharidinreizblaseninhalte.

Alle Untersucher bestätigten die nur relativ geringe Dauer des erzielten allergischen Zustandes. Etwa 1 - 3 Tage nach der Zellübertragung konnte die Tuberkulinallergie nachgewiesen werden. Nach wenigen Wochen, maximal nach 4 Monaten war sie wieder erloschen, ohne eine Tuberkulose oder Immunität zu hinterlassen. Ihre Intensität steht offenbar in gewisser Abhängigkeit von der Menge der übertragenen Zellen und dem Grade der Allergie des Spenderorganismus.

Von Bedeutung erscheint außerdem die Beobachtung von H.S. L a w r e n c e (1954), daß passive Übertragung der Tuberkulinhautempfindlichkeit bei Verwendung von Leukocyten gelang, die durch wiederholtes Gefrieren und Auftauen, sowie durch Verwendung von Desoxyribonukleinase oder Ribonucleinase desintegriert und teilweise chemisch abgebaut waren. M.M. C u m m i n g s und Mitarbeiter (1956) erzielten den gleichen Effekt durch Injektion von Extrakten, die aus Peritonealexsudaten und Milzgewebe

durch Zerstörung der Zellen mit Ultraschall gewonnen wurden. Bei Erhitzen dieser Extrakte auf 60 Grad C für 15 min. ging diese besondere Eigenschaft verloren.

Diese exakten Untersuchungen und übereinstimmenden Ergebnisse berechtigen zu der Schlußfolgerung, daß der Sitz der Antikörper, die durch die Tuberkuloseinfektion entstanden sind, in oder an den Zellen zu suchen ist.

Eine weitere Sicherung erfuhr diese Annahme durch die zahlreichen Untersuchungen über die Wirkung des Tuberkulin auf isolierte Blut - und Gewebszellen des tuberkulösen Organismus.

In einer der frühesten Arbeiten zu diesem Problem berichtet P.M. H o l s t (1922), daß die Leukocytenausschwärmung durch Tuberkulinzusatz gehemmt wird und die Phagocytosefähigkeit dieser Leukocyten deutlich abnimmt.

1931 konnte J.D. A r o n s o n in eindrucksvollen Versuchen nachweisen, daß Tuberkuline aus humanen und bovinen Bakterienstämmen einen toxischen Effekt auf Zellen tuberkulöser Meerschweinchen ausübt. Im Gegensatz dazu zeigten Zellen eines mit Pferdeserum anaphylaktisch sensibilisierten Tieres keine Veränderungen, wenn ihnen Pferdeserum zur Gewebeskultur zugeführt wurde.

Größere Beachtung erfuhr aber erst die Veröffentlichung von A.R. R i c h und M.R. L e w i s (1932), die auf eine spezifische, selektive Schädigung von Milzgewebe und Leukocyten tuberkulöser Meerschweinchen durch Zusatz von Tuberkulin aufmerksam machten. Sie suspendierten das Zellmaterial in normalem Plasma, welchem sie Alttuberkulin in einer Konzentration von 1 : 60 zusetzten. Nach einer anfänglichen Periode normaler Auswanderung sahen sie eine Herabsetzung der Migrationsfähigkeit und deutliche Verkürzung der Lebensdauer so behandelter Zellen, während unter gleichen Bedingungen das Zellmaterial nicht tuberkuloseinfizierter Tiere keine Beeinflussung erfuhr. Negative Ergebnisse früherer Untersuchungen führten sie auf die Verwendung zu schwacher Tuberkulininkonzentrationen zurück.

J.K. M o e n und H.F. S w i f t (1936) haben noch bei der dritten und späteren Gewebekulturgeneration dieser Milzzellen eine Tuberkulinempfindlichkeit feststellen und damit humorale Faktoren für diese Vorgänge ausschließen können.

Durch eine große Zahl experimenteller Befunde konnte die Teilnahme weißer Blutzellen von Mensch und Tier an der Tuberkuloseallergie belegt werden, wobei allerdings sehr unterschiedliche Ergebnisse berichtet wurden. D.H. H e i l m a n, W.H. F e l d m a n und F.C. M a n n (1944) bestätigen zwar allgemein einen cytotoxischen Effekt des Tuberkulin auf sensibilisierte Zellen, schreiben aber in absteigendem Grade Makrophagen und Fibroblasten aus Milzgewebe, Granulocyten und Lymphocyten verschiedene Empfindlichkeitsstärken zu. In einer anderen Arbeit verweisen D.H. H e i l m a n und F.B. S e i b e r t (1946) darauf, daß Lymphocyten am wenigsten, Monocyten nur nach längerer Dauer und Neutrophile am schnellsten der Tuberkulincytolyse unterliegen.

Mit besonderem Interesse hat sich vor allem ein Arbeitskreis der Havard - Universität um C.B. F a v o u r der Erforschung dieser Probleme angenommen. In einer der ersten Arbeiten (C.B. F a v o u r 1947) konnte er eine Zellauflösung der Leukocyten tuberkuloseinfizierter Tiere nach Tuberkulinzusatz und Inkubation im Brutschrank nach Ablauf einer Stunde bestätigen. In späteren Arbeiten wurden diese Ergebnisse kritisch untersucht und das Vorhandensein eines Plasmafaktors in Erwägung gezogen. So sahen J.M. M i l l e r, C.B. F a v o u r, B.A. W i l s o n und M.A. U m b a r g e r (1949) bei Suspension von Leukocyten Tuberkulosekranker in Normalserum unter Tuberkulinzusatz keinen Cytolyseeffekt, während sie bei Suspension Gesunder in Krankenserum unter Tuberkulinzusatz eine deutliche Cytolyse beobachten konnten. Sie sind daher der Ansicht, daß der spezifisch cytolytische Faktor nicht

an den Zellen, sondern im Serum zu suchen sei und führen andere Ergebnisse auf eine nicht genügend sorgfältige Trennung der Zellen vom Serum zurück.

Schließlich berichteten L.R. C o l e und C.B. F a - v o u r (1955), daß es ihnen gelungen sei, diesen Plasmafaktor in einer bestimmten Plasmafraktion, die sie als " Fraktion IV - 10 " bezeichneten, zu isolieren. Mit dieser Plasmafraktion konnten sie Tuberkulinempfindlichkeit von sensibilisierten auf gesunde Meerschweinchen übertragen. Jedoch gelang das nur mit sehr großen Plasmamengen (über 100 ccm pro Meerschweinchen) und mit dem Ergebnis sehr geringer Hautreaktionen im Gegensatz zu den bei aktiv sensibilisierten Tieren beobachteten stärkeren Reaktionen. Außerdem mußten die Spendertiere 2 Tage vor der Blutentnahme mit Tuberkulin getestet werden, anderenfalls die Übertragung nicht gelang. Ihre Ergebnisse konnten aber in einer Nachprüfung der Versuche durch E h r e n - k r a n z und W a k s m a n zitiert nach H. B l o c h und E. S u t e r (1958) nicht bestätigt werden.

In einzelnen der folgenden, noch zu besprechenden Untersuchungen wurden die Versuchsansätze so gewählt, daß selbst bei Außerachtlassung eines möglichen zusätzlichen Plasmafaktors die spezifisch cytolytische Wirkung des Tuberkulin auf sensibilisierte Leukocyten unter Beweis gestellt werden konnte.

K. L a n g n e r (1950) untersuchte das Ausschwärmen der Leukocyten auf Placentarextrakten als Nährböden. In austauschenden Versuchen konnte er zeigen, daß durch Zusatz von Tuberkulin Leukocyten gesunder Personen in ihrer Ausschwärmung nicht beeinträchtigt werden. Von Plasma befreite Leukocyten Tuberkulöser zeigten dagegen in einem Teil der Fälle eine Ausschwärmhemmung, während in anderen Fällen die Hemmung zumindest nicht sicher erkennbar war. Zudem konnte er auch eine Ausschwärmhemmung bei Leukocyten gesunder Personen feststellen, die im Plasma Tuberkulöser suspendiert waren. Er glaubt deshalb auf das Vor-

handensein hemmender Faktoren sowohl an den Zellen als auch im Plasma Tuberkulöser schließen zu müssen, die sich in ihrer Wirkung summieren. Eine feste Beziehung zur Ausdehnung, Schwere und Dauer der Erkrankung konnte er aus dem verschiedenen Grad der Ausschwärmhemmung nicht ableiten.

S. W i t t e (1957) beschrieb degenerative Zellveränderungen an Explantatleukocyten des menschlichen Blutes, die sich auf Tuberkulineinwirkung nach 90 min bis 24 Stunden erkennen ließen und als Vakuolenbildung im Cytoplasma in verschieden starkem Maße bis zur vollständigen Zellauflösung in Erscheinung traten.

Obwohl in diesen Untersuchungsergebnissen divergierende Ansichten über den Grad der cytotoxischen Tuberkulinwirkung auf sensibilisierte Gewebe zum Ausdruck kommen, läßt sich nicht bestreiten, daß in der überwiegenden Mehrzahl der Versuchsansätze eine zellzerstörende Wirkung durch Tuberkulin nachweisbar war. Andererseits mußte der cytolytische Effekt eine wahrscheinliche, aber unbewiesene Annahme bleiben, solange dieser Vorgang nicht an der Einzelzelle erwiesen werden konnte.

Unter diesem Gesichtspunkt hat F. S c h m i d (1953) sein Untersuchungsmaterial mikroskopisch - morphologisch näher analysiert.

Er verwendete verschiedene Zellarten mesenchymaler Herkunft: Peritonealexsudatzellen, Milz - und Lymphknotengewebe und Liquorzellen. Nach Zentrifugieren und Waschen der Zellen suspendierte er sie in Ringer - oder Tyrode - lösung und ließ neben Leerkontrollen Alttuberkulin - Lösungen in verschiedenen Verdünnungen - als Standardverdünnung wählte er 1 : 20 - auf die Zellen einwirken. Nach 60 - 90 min Stehen bei Zimmertemperatur fertigte er Objektträgerausstriche an, die er nach Pappenheimfärbung einer Auszählung und morphologischen Betrachtung unterzog. Er stellte zunächst in Übereinstimmung mit anderen Autoren fest, daß so präparierte Zellen tuberkulinnegativer Reagenten keine Veränderungen erfahren, während Zellen tuberkulöser Tiere unter gleicher Behandlung einen von Fall zu Fall verschieden hohen Prozentsatz destrukturierter Zellen aufwiesen, deren Einzelwerte stark zwischen 9 und 82 % schwankten. Im Durchschnitt waren bei Peritonealzellen und Milzgewebe 29,6 %, bei Lymphknotenzellen 28,8 %

Zellen mehr zerstört als in den Kontrollversuchen ohne Tuberkulinzusatz.

Beim Studium der morphologischen Veränderungen beschrieb er, angefangen von " fadenförmigen Ausziehungen des Protoplasma " bis zur " Cytoplasmaauflösung und Kernzertrümmerung ", alle Zwischenstufen der Zellauflösung. In ausgeprägten Formen glaubte er " durchaus charakteristische Bilder " von " innen heraus gesprengten Zellen " gesehen zu haben. Da die so beschriebene Cytolyse nur an Zellen sensibilisierter Tiere eintrat, folgerte er daraus die Spezifität des dabei ablaufenden Prozesses.

Gestützt auf licht - und elektronenoptische Untersuchungen hat sich F.J. B a s s e r m a n n (1954) mit diesen Beobachtungen kritisch auseinandergesetzt. Erstmals beschrieb er die Vorgänge am Cytoplasma spezifisch sensibilisierter Leukocyten, die sich bei der Einwirkung von Tuberkulin auf diese Zellen abspielen und zwar in Dimensionen der cytoplasmatischen Ultrastruktur, die allein im elektronenoptischen Auflösungsbereich zugänglich sind. In einer vorangehenden Arbeit (F.J. B a s s e r m a n n 1954) hatte er bereits in Zusammenhang mit elektronenoptischen Untersuchungen zur experimentellen Tuberkelbazillen - Phagocytose seine Beobachtungen über die prämortalen und nekrobiotischen Veränderungen der Leukocyten mitgeteilt. Er stellte fest, daß die Zelle auf exogene Schädigungen sehr verschiedenartig, aber in den morphologischen Ausdrucksformen doch nur begrenzt reagieren kann. Er beobachtete weiter, daß die Zelle in ihrer amoeboiden Ausbreitungsform äußerst verletzlich ist und schon geringster Druck oder das Vorbeistreichen einer Luftblase genügt, um eine vorgeschädigte Zelle zum Platzen zu bringen und eine eruptive Entleerung des Zellinhaltes herbeizuführen. Dabei kamen Bilder zur Beobachtung, welche weitgehende bis völlige Übereinstimmung mit denen zeigten, wie sie von F. S c h m i d als " durchaus charakteristische " und " spezifische Tuberkulineffekte " an sensibilisierten Zellen interpretiert

worden sind.

B a s s e r m a n n ist der Ansicht, daß es sich bei den von S c h m i d demonstrierten Photographien nicht um die Wiedergabe zellspezifischer Reaktionen auf die Tuberkulinwirkung handelt, sondern um Artefakte der durch die Ausstrichpräparation in starkem Maße traumatisierten Zellen. Als wesentlichste Voraussetzung für derartige Untersuchungen hält er es deshalb für notwendig, daß alle Methoden der Aufbereitung vermieden werden, die zu einer Traumatisierung der aus ihrem physiologischen Milieu entfernten Zellen führen können. Waschen, Zentrifugieren, Einbringen der Leukocyten in sogenannte physiologische Lösungen, Zusätze gerinnungshemmender Mittel sowie mechanisches Ausstreichen der Zellen seien Maßnahmen, die im Bereich dieser hier zu untersuchenden Vorgänge von vornherein einen feineren Einblick in den morphologischen Bereich der cytolytischen Tuberkulinwirkungen verhindern.

Für seine Untersuchungen benützte er u.a. Vitalpräparationen, wie sie auch für unsere Versuche Verwendung fanden und später noch näher beschrieben werden, sowie Präparationen mit Fixierung, Färbung und Schrägbedampfung sowie Elektronenpräparationen auf Formvar - Membranen. Die serumfreien Vitalpräparationen wurden im direkten Kontakt mit Tuberkulinlösungen verschiedener " gereinigter " Tuberkulinpräparate in Konzentrationen von 1 : 160 bis 1 : 1600 im Dunkelfeld beobachtet oder nach Fixierung und Färbung statistisch ausgewertet.

An Hand sehr eindrucksvoller Mikrophotogramme dokumentierte er in seiner Arbeit zwei verschiedene Formen der Tuberkulinleukolyse.

Die eine, charakterisiert durch eine fast momentan eintretende Dekomposition der hoch sensibilisierten Zellen, wurde von ihm wie folgt beschrieben:

" Der hyalinhomogene Teil des Ektoplasmas, zusammen mit den weitverzweigten Dendriten oder auch dem wabernden Ektoplasmasaum, löst sich in zahlreiche, unterschiedlich große Tropfen auf, die von vacuoligen Blasen durchsetzt sein können. Das ursprüngliche Zellareal bleibt noch

kurze Zeit markiert, aber eine kontinuierliche Zellbegrenzung besteht nicht mehr. Die Granula sind rasch ausgeschwemmt, aufgelöst oder elektrostatisch entladen und dann in Kernnähe zusammengeklumpt. Eine Kernmembran ist nur noch selten erkennbar, der Inhalt ist abgeschwemmt, Nucleoli können am längsten erhalten bleiben. Das Zellrudiment zeigt im Dunkelfeld nur noch ein mattes Gelb oder einen Grauschimmer im Gegensatz zu der in voller Vitalität befindlichen Zelle, deren strukturierte Anteile ein grelles, stahlblaues Leuchten zeigen."

Er bezeichnete diese Form als " anaphylaktische " Tuberkulinleukolyse, weil, wie beschrieben, die Auflösung der zellulären Struktureinheit unmittelbar nach dem Kontakt des Tuberkulin mit der Zelle, gleichsam explosionsartig, erfolgte.

Neben dieser äußerst rasch ablaufenden Form, die sich in ihrer Häufigkeit auch statistisch erfassen ließ, konnten langsamer ablaufende Störungen, die aber ebenfalls zur Destruktion und Auflösung der Zelleinheit führten, beobachtet werden. Diese jedoch unterschieden sich nicht wesentlich gegenüber früher beobachteten und beschriebenen prämortalen und nekrobiotischen Veränderungen von Leukocyten in einem unphysiologischen Milieu.

Gegenüber Leerkontrollen, unter sonst streng identischen Versuchsbedingungen, ließ sich unter der Einwirkung von Tuberkulin eine zahlenmäßig häufigere und in den einzelnen Phasen zeitlich beschleunigtere Zerstörung der sensibilisierten Leukocyten nachweisen.

B a s s e r m a n n deutet die Tuberkulincytolyse als eine spontane Zerstörung der Zelle als hydrophildisperses, kolloidales System, wobei die auslösende molekulare Reaktion spezifischer Natur ist. Über den eigentlichen biochemischen und mikromolekularen Vorgang der Antigen-Antikörperreaktion innerhalb der Zelle kann dagegen bisher keine Aussage gemacht werden.

Die Ergebnisse der hier in gedrängter historischer Übersicht wiedergegebenen experimentellen und morphologischen Untersuchungen über die Wirkung des Tuberkulin auf spezifisch - sensibilisierte Zellen des tuberkulösen Organismus können folgendermaßen zusammengefaßt werden:

1. Die Tuberkulinwirkung im tuberkuloseinfizierten Organismus stellt ein echtes, allergisches Phaenomen dar.
2. Tuberkulin ist kein Antigen, sondern nur ein Halbantigen oder Hapten. Es kann nur¹⁾ vorhandenen Antikörpern reagieren, aber nicht selbständig sensibilisieren.
3. Der Sitz der durch die Tuberkuloseinfektion entstandenen Antikörper ist in oder an Zellen mesenchymaler Herkunft zu suchen. Die direkte Reaktionsfähigkeit solcher Zellen auf Tuberkulinzusatz ohne Mitwirkung von Plasma ist erwiesen.
4. Die Mitwirkung eines zweiten humoralen Antikörpers im Ablauf der Tuberkuloseallergie in vivo ist möglich und wahrscheinlich.

Humorale Antikörper spielen im Rahmen der Diskussionen über das Problem der Tuberkulose - Allergie in ihrer Beziehung zur Immunität und Resistenz neuerdings eine wesentliche Rolle, vor allem in den Arbeiten von W. Berdel und E. Buddecke (1950), W. Berdel, O. Rubner und G. Wiedemann (1954) und O. Rubner und E. Buddecke (1957). Diese Autoren stellten eine Theorie über einen allergischen Stufenablauf im tuberkulösen Organismus auf, die hier nur erwähnt werden, aber undiskutiert bleiben kann, weil sie über das Thema dieser Arbeit hinausführen würde.

3. Problemstellung.

Auf Anregung des Herrn O.Med.Rat Dr. F.J. B a s s e r -
m a n n habe ich mir die Aufgabe gestellt, die cytoly-
tische Wirkung von Tuberkulinlösungen auf sensibilisierte
Mesenchymzellen einer statistischen Prüfung zu unter-
ziehen.

Ich ging von folgenden Überlegungen aus:

- 1) Wenn es zutrifft, daß Tuberkulin - Lösungen eine spe-
zifisch cytolytische Wirkung auf sensibilisierte Zel-
len haben, so muß diese - bei sonst identisch vorbe-
handelten Präparaten - gegenüber Leerkontrollen und
Kontrollen, auf die eine indifferente physiologische
Lösung einwirkt, statistisch zu sichern sein.
Dazu muß mit Hilfe der Leerkontrollen gesichert wer-
den, daß die verwendete "indifferente" Lösung keine
eigene cytolytische Wirkung besitzt.
Ergibt sich eine eigene cytolytische Wirkung dieser
Lösung, so wäre zu prüfen, ob sich der cytolytische
Effekt dieser Lösung gegenüber dem der Tuberkulin-
lösungen statistisch sichern läßt.
- 2) Wenn sich die Annahme einer spezifisch cytolytischen
Wirkung von Tuberkulinlösungen bestätigen läßt, wäre
zu prüfen, ob eine Abhängigkeit zwischen verschiede-
nen Tuberkulinkonzentrationen und dem Cytolysegrad
erkennbar und statistisch zu sichern ist.
- 3) Bei der von verschiedenen Seiten vermerkten Beobach-
tungen, daß Leukocyten des peripheren Blutes Tuber-
kulosekranker von überraschender Hinfälligkeit sind,
drängt sich die Frage auf, ob andere Zellen des mesen-
chymalen Systemes von aktiv Tuberkulösen auf Tuberkulin
einwirkung in gleicher Weise mit einer Cytolyse em-
pfindlich reagieren, wie es bei den Blutleukocyten
beschrieben wurde. Wenn die Zellen unter identischen
Versuchsbedingungen aufbereitet werden, müßte sich

ein möglicherweise vorhandener Unterschied in der Tuberkulinempfindlichkeit durch die Cytolysewirkung zu erkennen geben und statistisch zu sichern sein.

- 4) Wenn mesenchymale Zellelemente der Tuberkulincytolyse unterliegen, worüber auf Grund der Ergebnisse zahlreicher Explantatuntersuchungen kaum Zweifel bestehen dürften, was aber durch unsere Untersuchungen erneut zu bestätigen wäre, erhebt sich die Frage, ob die Dauer der Tuberkulineinwirkung auf den Eintritt des cytolytischen Effektes einen Einfluß hat. Durch entsprechende Versuchsansätze müßte eine vermutliche Abhängigkeit ebenfalls eine statistische Sicherung erfahren können.

4. Vorversuche, Beobachtungen und Diskussion technischer Probleme.

Das zu untersuchende Zellmaterial stand mir aus dem großen und vielgestaltigen Krankengut aktiv Tuberkulöser der Lungenheilstätte Donaustauf zur Verfügung. Bei meinen Vorversuchen verwendete ich zunächst nur Blutleukozyten als Testobjekte, da sich diese in der amöboiden Ausbreitungsform zur Demonstration des anaphylaktisch - cytolytischen Tuberkulineffektes als besonders geeignet und empfindlich erwiesen haben. (F.J. B a s s e r m a n n 1954) Besondere Aufmerksamkeit mußte den Problemen der präparativen Artefakte sowie der unspezifischen Cytolyse gewidmet werden. Eine weitere wichtige Voraussetzung für die statistische Auswertung und phototechnische Reproduzierarbeit war die Gewinnung einer in der Fläche gleichmäßig verteilten, übersichtlichen Zellpopulation.

Wegen der bekannten und gesteigerten Hinfälligkeit und Lädierbarkeit der Leukozyten Tuberkulose-kranker wurde auf die bisher bei anderen Untersuchern üblichen Methoden der Aufbereitung des Zellmaterials, wie: Ausstreichen, Zentrifugieren, Waschen des Blutes sowie die Verweilung

gerinnungshemmender Mittel strikte verzichtet.

In der Eigenschaft der Wanderzellen, im stehenden Blute zu sedimentieren, auf Flächen zu haften und sich auszuweiten, bot sich eine Möglichkeit, auf schonenste Weise lebende Zellen zu gewinnen.

Es ist bekannt, daß Artefakte vor der Fixierung von Vitalpräparationen trotz vorsichtigster Behandlung kaum völlig zu vermeiden sind. Die dem Organismus entnommenen Zellen, ihren physiologisch - physiko - chemischen Regulationen entzogen, erfahren durch Sauerstoffnot und Erhöhung der CO_2 -Spannung sowie andere unübersehbare Zustandsänderungen sehr leicht Schädigungen, die bei derartigen Versuchen niemals völlig verhindert werden können. Deshalb war es notwendig Vorsorge zu treffen, den physiologischen Verhältnissen so weit als möglich nahezukommen. Spritzen, Kanülen, Objektträger, Küvetten, alle verwendeten Lösungen wurden grundsätzlich auf Körpertemperatur vorgewärmt und erst unmittelbar vor dem Gebrauch dem Brutschrank entnommen. Um unerwünschte Haufenbildungen und Aggregationen der Zellen zu vermeiden, wie sie häufig an Kratzern der Objektträger auftreten, wurden immer nur neue, fettfreie Stücke verwendet.

Methoden zur Gewinnung der Zellpopulation.

In meinen Vorversuchen habe ich verschiedene Möglichkeiten der Zellabsiedlung sowohl an Blut -, als auch an histiocytären Zellen untersucht, um die geeignetste Standard - Methode zu entwickeln.

Methode A)

Ein querhalbierter Objektträger wird mit einer, der Cubitalvene mit großer Kanüle entnommenen, genau abgemessenen Menge Blutes überschichtet. Die Verwendung jeweils gleicher Blutmengen ist notwendig, um für eine Versuchsreihe auch maximal gleiche Voraussetzungen zu schaffen.

Das Blut muß den Objektträger völlig bedecken, damit später das Abgleiten des Blutkuchens ohne Schwierigkeiten vonstatten geht. Es darf aber auch nicht über den Rand des Objektträgers ablaufen. Zur Verhinderung der Austrocknung und Abkühlung werden die Objektträger in feuchter Kammer 30 - 60 min inkubiert. Das Blut gerinnt in kurzer Zeit im Brutschrank bei 37° C. Der auf dem Serum schwimmende Blutkuchen kann nun leicht abgekanntet werden. Haftet der Blutkuchen an den Rändern, darf nur äußerst vorsichtig nachgeholfen werden, da die abgleitende Masse sehr leicht die abgesiedelten Zellen mit sich zieht, wodurch das Präparat unbrauchbar wird. Unter vorsichtigem Hin - und Herbewegen erfolgt eine kurze Spülung in körperwarmer, pH - neutraler Tyrodelösung. Dadurch werden die noch anhaftenden Plasma und Fibrinreste abgeschwemmt. Eine besondere Präparation der Objektträger erweist sich als überflüssig und unzweckmäßig. Die Präparate werden in wasserfreiem Methyl - Alkohol 3 min fixiert und anschließend kurz in Aqua dest. gespült.

Die so erhaltenen Präparate zeigen im allgemeinen einen gleichmäßigen Film abgesiedelter Wanderzellen. Wenn, wie angedeutet, der Blutkuchen mangels Retraktion nicht unbehindert abgleiten kann, entstehen streifenartige Bahnen auf dem Leukocytenfilm. In diesen Bereichen sind dann mikroskopisch zahlreiche zerstörte Zellen und dichte Ballungen erkennbar. Solche Präparate sind für eine statistische Auswertung unbrauchbar.

Wird länger als 60 min inkubiert, sind manche Zellen bereits erheblich durch prämortale und nekrobiotische Veränderungen entstellt. Es zeigt sich auch, daß solche unspezifisch - cytolytische Erscheinungen gelegentlich bereits nach kürzerer Inkubationsdauer auftreten. Man wird diese Vorgänge als Bestätigung der häufig vorgehobenen Hinfälligkeit der Blutleukocyten Tuberkulöser ansehen können.

Es fiel auf, daß Monozyten nicht oder nur selten von solchen Abbauvorgängen betroffen waren. Morphologisch erschienen die absterbenden Zellen vergrößert. In Vitalpräparaten fehlte ihnen die Protoplasmaströmung. Die Kerne waren plump verquollen oder wirkten tinktoriell abgeblaßt. Die Dendriten schienen plumper als bei ungeschädigten Zellen oder waren nur in geringerer Zahl zu erkennen. Vakuolenbildungen verschiedener Größe bis zu scheinbar vollständiger Auflösung des Zellinhaltes und Verbleib der Zellumgrenzung konnten beobachtet werden. Diese unspezifischen Abbauförmn der Leukocyten wurden schon früher beschrieben und zum Teil fotografisch dokumentiert, u. a. von E. U n d r i t z (1941) S. W i t t e (1950) W. L a v e s (1954) und F.J. B a s s e r m a n n (1954).

Diese Methode habe ich versuchsweise wie folgt abgewandelt:

Methode B)

Unter Beachtung der bereits beschriebenen Kautelen wird ein Blutstropfen auf den Objektträger aufgebracht und vorsichtig mit einem dünnen Deckglas bedeckt. Es erfolgt Inkubation in feuchter Kammer für 30 - 60 min. Danach läßt sich das Deckglas ohne Schwierigkeiten in körperwarmer Tyrodelösung abspülen. Die Fixierung erfolgt wie bei Methode A.

Der unter dem Deckglas ausgebreitete Blutstropfen hinterläßt eine sehr zarte und gleichmäßige Absiedlung von Leukocyten. Die Zellen liegen im allgemeinen weniger dicht, als bei der vorher beschriebenen Methode. Wenn das Deckglas auf dem Blute geschwommen ist, treten Artefakte kaum in Erscheinung. In den meisten Fällen wurde es aber durch die Kapillarwirkung an einer Seite stärker als an der anderen angesaugt. Durch die verschiedenen Höhenunterschiede des Blutspiegels auf dem gleichen Objekt ergeben sich wesentliche Differenzen der Zellzahlen in den einzelnen Gesichtsfeldern. Die Unterschiede sind umso auffälliger,

als die Gesamtzahl der abgesiedelten Zellen wegen des kleinen Volumens des Blutstropfens nur relativ gering ist. Der Versuch, den Blutspiegel durch leichten Fingerdruck auf das Deckglas in der ganzen Ebene gleichmäßig hoch zu gestalten, erwies sich als deutliches Trauma für die Zellen. Dadurch zeigten sich wesentlich mehr Zellzusammenballungen und Artefakte, als bei den anderen Präparaten. Einen Vorteil gegenüber der Methode A konnte ich nicht erkennen.

Bei einer Reihe anderer Vorversuche habe ich als gerinnungshemmendes Mittel 3,8 %iges Natriumcitrat zugesetzt. Die Sedimentierung und Absiedlung wurde dadurch nicht verbessert. Es bestätigten sich vielmehr die bereits oben erwähnten Angaben von B a s s e r m a n n, daß dadurch die Leukocyten eine zusätzliche, unspezifische Schädigung erfahren. In diesen Präparaten waren durchschnittlich mehr Artefakte festzustellen als bei Präparationen ohne Zusatz von Natriumcitrat, sofern letztere mit sorgfältigster Technik aufbereitet waren.

Natriumcitrat schädigt die außerordentlich empfindlichen Leukocyten und verändert die Art ihrer Ausbreitung. Die so behandelten Zellen besitzen eine viel größere und strukturell andersartige Oberfläche als die kugelige Reizform un behandelter Zellen.

In den bisher beschriebenen Vorversuchen kamen Blutleukocyten zur Verwendung, die sich aber wegen ihrer außerordentlichen Verletzbarkeit und auffällig frühzeitig einsetzenden Absterbevorgänge, für meine beabsichtigten statistischen Prüfungen nur begrenzt eigneten. Es lag daher nahe, auch die histiocytären Zellen in meine Untersuchungen einzubeziehen, denen L. H e i l m e y e r (1951) gegenüber Blutleukocyten eine geringere Hinfälligkeit zuspricht. Thoraxchirurgisches Krankengut bot die Möglichkeit, das Extravasat frischer Pneumolysenhöhlen und und Pleuraergüsse zu untersuchen. Auch bei diesem Material mußte zunächst die zweckmäßigste Form der Aufbereitung empirisch erarbeitet werden.

Es ist notwendig, die meist sehr zellreichen Extravasate unmittelbar nach Punktion, noch körperwarm zu verwenden, da bereits nach wenigen Minuten eine starke Sedimentierung erfolgt. Ein Aufschütteln gelingt nur noch unvollkommen und schädigt deutlich die aggregierten Zellen.

Methode C)

In eine 3 cm hohe Petrischale werden mehrere Objektträger, einseitig dem Rande aufliegend, eingestellt und mit dem Extravasat überschichtet. Während der Inkubation bei 37 Grad C im Brutschrank für 30 - 60 min sedimentieren die Zellen auf dem Objektträger. Nach sehr vorsichtigem Spülen in körperwarmer Tyrodelösung sind sie mikroskopisch als gleichmäßig erscheinender Zellfilm zu erkennen. Fixierung wie unter A.

Mikroskopisch zeigte sich, daß durch die unterschiedliche Höhe des Flüssigkeitsspiegels auf den unteren Abschnitten des Objektträgers eine wesentlich dichtere Zellabsiedlung erfolgt war. Sie kam in extremen Zellzahlunterschieden bei der Auszählung der Präparate zum Ausdruck. Obwohl sich die histiocytären Elemente gegenüber den Blutleukocyten als deutlich widerstandsfähiger und weniger verletzlich erwiesen - nur sehr selten waren Artefakte erkennbar -, habe ich auch diese Aufbereitung nicht als Standardmethode erwählt, weil sich wegen der unterschiedlichen Zellverteilung zu große Streuungen und damit Fehlerquellen für die statistische Auswertung ergeben hätten.

Methode D)

In einer großen Petrischale werden 3 Objektträger auf Holzstäbchen nebeneinander eingebracht und mit dem Extravasat überschichtet, so daß über allen Objektträgern eine gleichmäßig hohe Flüssigkeitssäule zu stehen kommt.

Inkubation in feuchter Kammer bei 37 Grad C für 30 - 60 min. Je geringer die Höhe des Flüssigkeitsspiegels ist, um so weniger Zellen sedimentieren auf der Objektträgeroberfläche.

Abb. 1 a - c

3 Gesichtsfelder
der gleichen Präpa-
ration, als Beleg
für die geringe num-
merische Streuungs-
breite einer Zellab-
siedelung.

Pneumolysenpunktat
Leerkontrolle.

a)



b)



c)



Eine geringe Zellpopulation ist aber gerade erwünscht, weil es dadurch möglich wird, den Tuberkulineffekt an der Einzelzelle besser beobachten zu können.

Die Fixierung erfolgt wie nach A.

Die so gewonnenen Präparate zeichneten sich durch einen besonders gleichmäßigen Film leukocytärer und histiocytärer Zellen aus. (Abb. 1a - c) Artefakte kamen nach routinemäßiger Einarbeitung und bei sorgfältiger Beachtung aller früher beschriebenen Kautelen kaum mehr zur Beobachtung. Dagegen bot sich relativ häufig das Phaenomen der Zellaggregation, das sich trotz sorgfältiger Handhabung nicht vermeiden ließ. Da es sich dabei aber nicht um artifizielle Zusammenballungen wie in Ausstrichpräparaten handelt - morphologisch sind die Zellen unversehrt -, eigneten sich die Präparate durchaus für die statistische Auswertung. Objekte mit massenhaften Zellaggregationen wurden wegen ihrer Unübersichtlichkeit von vornherein ausgeschieden.

An über 100 Präparaten habe ich in orientierenden Vorversuchen die zuvor beschriebenen Methoden auf ihre Brauchbarkeit untersucht. Ich stellte fest, daß scheinbar unbedeutende Variationen das Kollektiv der Zellpopulation so nachhaltig beeinflussen können, daß dadurch eine exakte Auswertung erschwert, wenn nicht gar unmöglich wird. In der Verwendung der Extravasate glaube ich jedoch, ein weiteres geeignetes Material für Versuche über die Tuberkulinwirkung auf Wanderzellen des Mesenchyms gefunden zu haben. Die weiteren Experimente habe ich deshalb mit Zellabsiedlungen durchgeführt, die nach der zuletzt beschriebenen Methode (D) gewonnen wurden.

5. Versuchsanordnung:

Für die Versuchsansätze benötigte ich in einer Versuchsreihe drei homologe, unter identischen Bedingungen gewonnene Zellpopulationen: Präparat a als Leerkontrolle, Präparat b als erweiterte Kontrolle zum Ausschluß einer cytolytischen Wirkung durch unspezifische Faktoren und Präparat c als Testobjekt für den Nachweis der spezifisch cytolytischen Wirkung von Tuberkulinlösungen auf die sensibilisierten Zellen. Durch die in Abschnitt 4 ausführlich beschriebenen Vorversuche hatten sich die als Methode A und D bezeichneten Aufbereitungen als am geeignetsten erwiesen, aus Venenblut, Pneumolysenpunktaten und Pleuraergüssen brauchbare Zellabsiedelungen zu gewinnen.

Sie werden nochmals kurz erläutert:

Methode A)

Zellabsiedelungen aus Venenblut: 3 als a, b und c markierte Objektträger werden mit einer gleichmäßigen Menge Venenblut überschichtet. Das Blut muß die Objektträger völlig bedecken, darf aber nicht ablaufen. Inkubation in feuchter Kammer bei 37 Grad C für 30 - 60 min. Nach kurzer Zeit gerinnt das Blut. Der kontrahierte Blutkuchen gleitet leicht und völlig vom Objektträger ab. Durch vorsichtiges Hin- und Herbewegen in körperwarmer, pH - neutraler Tyrodelösung werden noch haftende Serum und Plasmarestes abgeschwemmt.

Methode D

Zellabsiedelungen aus Pneumolysenhöhlen - Extravasaten und Pleuraergüssen: 3 als a, b und c markierte Objektträger werden in eine große Petrischale nebeneinander eingebracht und mit frischem Punktat überschichtet. Inkubation in feuchter Kammer bei 37 Grad C für 30 - 60 min. Danach vorsichtiges Hin- und Herbewegen in körperwarmer pH -neutraler Tyrodelösung.

Die so gewonnenen 3 Vitalpräparate werden unverzüglich,

ihrer Markierung entsprechend, weiter bearbeitet:

Präparat a bleibt als Leerkontrolle unbehandelt und wird lufttrocken fixiert. (s.u.)

Präparat b kommt als erweiterte Kontrolle in reiner körperwarmer, pH - neutraler Tyrodelösung für 5 - 40 min bei 37 Grad C zur Inkubation.

Präparat c wird für die gleiche Zeit wie Präparat b der Einwirkung einer frischbereiteten, körperwarmen Tuberkulin - Tyrodelösung bei 37 Grad C, in geschlossener Küvette, im Brutschrank ausgesetzt.

Herstellung der Tuberkulin - Testlösungen:

Zur Verwendung kommen Alttuberkulin (Koch - AT) und gereinigtes Tuberkulin (GT - Hoechst). Es wird mit der Tuberkulinspritze entnommen und in graduierten Meßzylindern durch Zusatz von körperwarmer Tyrodelösung auf 500 : 1, 1000 : 1 und 2000 : 1 verdünnt.

Obwohl Tuberkulinlösungen nach Angabe von H. S c h m i d t R o h r und T. W i n n e w i s s e r (1956) in dieser Konzentration auch nach monatelanger, lichtgeschützter Aufbewahrung in ihrer Wirksamkeit nicht nachlassen sollen, habe ich sie für meine Versuche täglich frisch zubereitet.

Nach gleichlanger Inkubation der Präparate b und c (sie betrug bei meinen Versuchen 5 - 40 min) wird Präparat b luftgetrocknet und fixiert. Präparat c wird nochmals vorsichtig in reiner Tyrodelösung gespült, um die ihm anhaftende Tuberkulinlösung zu entfernen.

Fixierung: Alle 3 Präparate werden, sobald lufttrocken, 3 min in wasserfreiem Methanol fixiert, anschließend in Aqua bidest. gespült und bei Zimmertemperatur getrocknet.

Färbung: Alle drei Präparate werden gleichzeitig mit einer stark verdünnten, protrahiert wirkenden Giemsa - Lösung gefärbt. (1 Tropfen Stammlösung auf 5 ccm Aqua bidest. für 50 - 70 min).

Nachspülen der Präparate in Aqua bidest, anschließend Trocknung im Brutschrank.

Mikroskopie: Untersucht wurde mit dem Zeiss - Standard - Mikroskop. Die photographischen Aufnahmen erfolgten mit der Aufsetzkamera und der photoelektrischen Meßeinrichtung nach Zeiss - Winkel.

Auswertung: Von den 3 Präparaten einer jeden Versuchsreihe (Abb. 2 - 4) wurden nach der Meander - Methode gleich viele Gesichtsfelder ausgezählt und aus der Summe der Zellzahlen jedes Präparates der Mittelwert errechnet und protokolliert. Die gezählten Häufigkeiten wurden nach statistischen Methoden ausgewertet. Als Anleitung für die statistischen Berechnungen benützte ich die " Wissenschaftlichen Tabellen " (1955) und H o s e m a n n ; Grundlagen der statistischen Methoden für Mediziner und Biologen (1949).

6. Versuchsergebnisse und Diskussion

Es wurden insgesamt 44 **Versuchsreihen** durchgeführt, 37 mit Extravasaten und weitere 7 mit Venenblut. Die Ergebnisse der Zellauszählungen aller Präparate sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Erläuterungen zu der Tabelle 1:

Die in den kolumnen a, b und c verzeichneten Zahlen stellen arithmetische Mittelwerte ($\bar{x}$) aus der Summe ($S(x)$) der Einzelergebnisse ($x_1, x_2, x_3 \dots$) aller Zellen dar, die bei der Durchsicht der Gesamtzahl der Gesichtsfelder (N) auf einem Präparat gezählt wurden.

Formel: $\bar{x} = \frac{1}{N} S(x)$.

Aus den so erhaltenen Zellzahlmittelwerten der Präparate einer Versuchsreihe läßt sich die Wirkung der Tyrodelösung (Präparat b) bzw. des Tuberkulin (Präparat c) im Vergleich zu der Leerkontrolle (Präparat a) arithmetisch berechnen. Im allgemeinen wird die zellschädigende Wirkung einer Substanz durch den cytotoxischen Index ausgedrückt (C. D i t t m a r und J. S i x e l 1954), den ich als "Cytolyse-Index" (CI) bezeichnen will. Er ist der Quotient aus der Zellzahl des Präparates, auf das Tyrodelösung bzw. Tuberkulin eingewirkt hat (Dividend) und der Zellzahl des Leerpräparates (Divisor). Die Tuberkulin - Cytolyse-Indizes (CIs) sind in Tabelle 1 verzeichnet.

1. Es war zunächst zu prüfen, ob unter der Einwirkung der Tyrodelösung ein signifikanter Unterschied in der Zahl der Zellen gegenüber den Leerkontrollen erkennbar ist, d.h. ob die Tyrodelösung selbst eine cytolytische Wirkung besitzt.

Der Unterschied, der sich bei der Auszählung der Präparate a gegenüber den Präparaten b ergibt, könnte auf Zufall beruhen oder Nichtzufall, d.h. Nichtübereinstimmung bedeuten. Ergäbe sich ein signifikanter Unterschied der Zellzahlen, so könnte dieser, wenn er eine Verminderung bei den Präparaten b ergibt, einer unspezifisch cytolytischen Wirkung der Tyrodelösung entsprechen.

Zu dieser Prüfung ging ich folgendermaßen vor:

Nach der Methode zur Prüfung der Signifikanz von Mittelwerten habe ich von den ersten 37 Versuchsreihen aus den gezählten Zellen der Präparate a und b Stichproben

T a b e l l e 1

Ergebnis der Zellauszählungen aller Versuchsreihen und
Wiedergaben des Tuberkulin - Cytolyse - Index (CI).
(Erläuterung im Text)

Lfd.Nr.der Vers.Reihen	Nr.der Versuchs- serie	Präparat. a (Leerkontr.)	Präparat b (Tyrode-Lsg.)	Präparat c (Tuberk.)	CI
1	1	13,0	14,2	0,9	0,069
2	2	19,2	18,7	3,9	0,203
3 (Serie 1	3	8,9	10,0	2,7	0,304
4 Tuberkulin-	4	14,3	12,8	4,2	0,293
5 konz.500:1)	5	8,1	11,2	2,7	0,333
6	6	12,1	14,0	2,4	0,198
7	7	33,7	31,5	14,2	0,421
8	8	47,0	41,0	31,2	0,663
9	9	5,2	4,9	2,3	0,442
10	10	28,8	20,4	9,3	0,322
11	11	31,4	28,4	14,0	0,445
12	12	8,3	8,5	5,0	0,602
13 (Serie 2	1	34,2	32,8	25,1	0,773
14 Tuberkulin-	2	36,0	28,2	10,6	0,294
15 konz.1000:1)	3	49,8	46,2	18,3	0,375
16	4	28,1	25,2	10,4	0,370
17	5	14,7	13,8	5,8	0,393
18	6	27,2	26,8	21,5	0,790
19	7	55,2	50,8	32,3	0,567
20	8	15,3	14,2	8,1	0,529
21	9	14,2	19,7	10,2	0,718
22	10	14,8	15,2	6,4	0,432
23	11	47,8	55,0	29,2	0,610
24	12	44,3	38,0	29,2	0,659
25	13	19,3	22,0	14,7	0,761
26	14	34,9	32,2	21,9	0,627
27	15	8,4	7,7	4,7	0,559
28	16	5,5	4,8	0,3	0,054
29	17	53,3	52,5	16,8	0,315
30	18	61,0	68,2	41,0	0,672
31 (Serie 3	1	12,4	13,6	10,1	0,814
32 Tuberkulin-	2	42,3	40,8	28,3	0,669
33 konz.2000:1)	3	35,1	32,2	14,8	0,421
34	4	4,3	7,8	1,2	0,279
35	5	21,0	24,0	13,6	0,647
36	6	15,4	12,3	11,1	0,720
37	7	34,3	34,0	16,6	0,483
38 (Serie 4	1	20,9	21,0	10,1	0,485
39 Venenblut	2	11,0	7,1	3,8	0,342
40 Tuberkulin-	3	24,1	22,1	15,2	0,628
41 Konz.1000:1)	4	19,1	20,1	10,0	0,576
42	5	8,8	9,1	4,3	0,482
43	6	27,8	25,9	20,3	0,730
44	7	31,4	27,2	14,7	0,468

(a - b = x) und den sich daraus ergebenden Mittelwert $\bar{x}$ errechnet. (s. Tabelle 2). Ich bestimmte ferner die Streuung s^2 , die Streuung des Mittelwertes $s\bar{x}^2$, sowie die Standard - Abweichung des Mittelwertes $s\bar{x}$. Da bei meinen Versuchen die Anzahl der Freiheitsgrade ($n = N-1$) kleiner als 60 ist, gehorcht die Verteilung der Mittelwerte der " t - Verteilung ". Die Abweichung t erhält man nach der Formel $t = \frac{\bar{x}}{s\bar{x}}$ mit der man aus der Tafel

für t - Verteilungen durch Eingehen mit dem Freiheitsgrad n die Wahrscheinlichkeit P entnehmen kann. Es ergibt sich folgende Rechnung:

$$\text{Mittelwert } \bar{x} = \frac{1}{N} S(x) = \frac{+25,2}{37} = + 0,68$$

$$\begin{aligned} \text{Streuung } s^2 &= \frac{(S(x^2) - \bar{x}S(x))}{N - 1} \\ &= \frac{477,64 - (0,68 \cdot 25,2)}{36} \\ &= \frac{477,64 - 23,14}{36} \\ &= \frac{454,56}{36} = 12,625 \end{aligned}$$

$$\text{Streuung des Mittelwertes } s_{\bar{x}}^2 = \frac{12,625}{37} = 0,341$$

$$\begin{aligned} \text{Standard - Abweichung des Mittelwertes } s\bar{x} &= \frac{1}{\sqrt{N}} s \\ &= \frac{\sqrt{12,625}}{\sqrt{37}} = \frac{3,55}{6,09} = 0,58 \end{aligned}$$

$$\text{Abweichung } t = \frac{\bar{x}}{s\bar{x}} = \frac{0,68}{0,58} = 1,172$$

T a b e l l e 2

Prüfung einer unspezifisch-cytolytischen Wirkung der Tyrode-Lösung auf sensibilisierte Zellen durch Vergleich mit unbehandelten Leerkontrollen, nach der Methode zur Prüfung der Signifikanz von Mittelwerten.

Lfd.Nr. der Vers. Reihen	Ausgez.Zellen Präparat a (Leerkontrollen)	Ausgez.Zellen Präparat b (Tyrode-Lsg.)	Differenz (a-b) a-b=x	$(a-b)^2 = x^2$
1	13,0	14,2	- 1,2	1,44
2	19,2	18,7	+ 0,5	0,25
3	8,9	10,0	- 1,1	1,21
4	14,3	12,8	+ 1,5	2,25
5	8,1	11,2	- 3,1	9,61
6	12,1	14,0	- 1,9	3,61
7	33,7	31,5	+ 2,2	4,84
8	47,0	41,0	+ 6,0	36,00
9	5,2	4,9	+ 0,3	0,09
10	28,8	20,4	+ 8,4	70,56
11	31,4	28,4	+ 3,0	9,00
12	8,3	8,5	- 0,2	0,04
13	34,2	32,8	+ 1,4	1,96
14	36,0	28,2	+ 7,8	60,84
15	49,8	46,2	+ 3,6	12,96
16	28,1	25,2	+ 2,9	8,41
17	14,7	13,8	+ 0,9	0,81
18	27,2	26,8	+ 0,4	0,16
19	55,2	50,8	+ 4,4	19,36
20	15,3	14,2	+ 1,1	1,21
21	14,2	19,7	- 5,5	30,25
22	14,8	15,2	- 0,4	0,16
23	47,8	55,0	- 7,2	51,84
24	44,3	38,0	+ 6,3	39,69
25	19,3	22,0	- 2,7	7,29
26	34,9	32,2	+ 2,7	7,29
27	8,4	7,7	+ 0,7	0,49
28	5,5	4,8	+ 0,7	0,49
29	53,3	52,5	+ 0,8	0,64
30	61,0	68,2	- 7,2	51,84
31	12,4	13,6	- 1,2	1,44
32	42,3	40,8	+ 1,5	2,25
33	35,1	32,2	+ 2,9	8,41
34	4,3	7,8	- 3,5	12,25
35	21,0	24,0	- 3,0	9,00
36	15,4	12,3	+ 3,1	9,61
37	34,3	34,0	+ 0,3	0,09

N = 37

S(x) + 25,2 S(x²) 477,64

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \cdot S(x) \quad \bar{x} = + 0,68$$

Für $t = 1,172$ liegt die Wahrscheinlichkeit P bei dem Freiheitsgrad $n = 36$ zwischen $0,30$ und $0,20$.

Wenn eine Abweichung sich signifikant von Null unterscheiden soll, so muß die Wahrscheinlichkeit P $0,05$ betragen oder kleiner sein.

Da bei meinen Versuchen die Wahrscheinlichkeit P größer als $0,05$ ist, kann eine Übereinstimmung als gesichert angenommen werden. Durch diese Prüfung konnte demnach gesichert werden, daß der bei der Auszählung von Präparat a und b beobachtete Unterschied der Zellzahlen auf Zufall beruht. Eine cytolytische Eigenwirkung der Tyrodelösung konnte damit ausgeschlossen werden.

Bei der Auszählung der Präparate c, auf die Tuberkulin, verdünnt in Tyrodelösung, eingewirkt hat, zeigt sich eine deutliche Verminderung der Zellzahlen gegenüber denen der Präparate a und b. (Tabelle 1). Da aber alle drei Präparate gleichzeitig unter identischen Bedingungen hergestellt wurden, kann kein Zweifel darüber bestehen, daß die Reduzierung der Zellen in Präparat c durch die Einwirkung des Tuberkulin auf die Zellen verursacht wurde. Durch das Verdünnungsmittel, die Tyrodelösung, kann die Verminderung nicht verursacht sein, da - wie zuvor bewiesen - die Tyrodelösung keine cytolytische Eigenwirkung besitzt.

Um nun die zellschädigende Wirkung des Tuberkulin arithmetisch ausdrücken zu können, habe ich die Cytolyse - Indizes errechnet. (Tabelle 1, letzte Spalte).

Diese Werte liegen in ihrer Gesamtheit so wesentlich unter 1, daß sich eine statistische Sicherung der Nicht-Übereinstimmung mit dem Werte 1, der die Indifferenz ausdrücken würde, erübrigt.

Die cytologische Wirkung des Tuberkulin ist daraus einwandfrei erkennbar.

3. Zur Klärung der Frage, ob eine Abhängigkeit zwischen der Stärke der einzelnen Tuberkulinkonzentrationen und der Größenordnung der Cytolyse - Wirkung besteht, waren die Cytolyse - Indizes der Versuchsserien 1 - 4 nach der sog. Null - Hypothese miteinander zu vergleichen. Da aus Versuchsserie 3 und 4 nur sieben Reihen zur Verfügung standen, wählte ich aus jeder Versuchsserie 7 Reihen als Stichproben aus.

Eine solche Auswahl durch Fortlassen seltener Extremabweichungen der Grundgesamtheit ist statthaft, wenn zwischen Extremwert und Ursache ein bewiesener Kausalzusammenhang besteht, d.h. wenn eine nicht zufallsbedingte Ursache für die Extremwerte nachweisbar ist. So waren u.a. die laufenden Versuchsreihen Nr. 1, 6 und 28 zu streichen, weil sie trotz sorgfältigster Aufbereitung in den Zellabsiedlungen unverhältnismäßig viele Artefakte enthielten. Die Extremwerte wurden außerdem nach dem Chauvent'schen Kriterium überprüft. Dieses besagt, daß Extremwerte je nach Anzahl der Messungen ausgeschlossen werden können, wenn sie größer als $\frac{s}{\sqrt{n}}$ ($x - \bar{x}$) sind, wobei s die Standardabweichung der Verteilung, ($x - \bar{x}$) die Abweichung vom Mittelwert bedeutet. Nur Werte, die diesem Kriterium entsprachen, wurden aus den Stichproben ausgenommen.

Durch die Methode zur Prüfung der Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte hatte ich die Differenzen der CI - Mittelwerte aus der Versuchsserie 1 (500:1) gegenüber denen der Versuchsserie 2 (1000:1) und Versuchsserie 3 (2000:1) statistisch zu prüfen.

Die Fragestellung lautete also: Wie groß ist die Wahrscheinlichkeit, daß die beobachtete Differenz der CI - Mittelwerte einem Zufall zugeschrieben werden muß, oder kann jeder der Tuberkulinlösungen eine verschiedene cytolytische Kraft zugesprochen werden?

Aus Tabelle 3 sind die Mittelwerte der Cytolyse - Indizes zu ersehen, die sich aus den Cytolyse - Indizes der Stichprobenwerte der Versuchsserie 1 - 4 ergeben haben.

Die Abweichung t mit der man die Wahrscheinlichkeit P des cytolytischen Wirkungseffektes der verschiedenen Tuberkulinlösungen bestimmen kann, erhält man durch

T a b e l l e 3

Errechnung und Wiedergabe der Mittelwerte der Cytolyse -
Indizes (CI) aus Stichproben der Versuchsserien 1 bis 4.

Versuchsserie 1			Versuchsserie 2		
Nr.	$CI_1=x_1$	x_1^2	Nr.	$CI_2=x_2$	x_2^2
2	0,203	0,041	1	0,733	0,537
3	0,304	0,092	3	0,375	0,141
4	0,293	0,086	5	0,393	0,155
5	0,333	0,111	7	0,567	0,322
7	0,421	0,117	9	0,718	0,516
8	0,663	0,440	11	0,610	0,372
10	0,322	0,104	13	0,761	0,579
N=7 $S(x_1)=$ 2,539			N=7 $S(x_2)=$ 4,157		
$S(x_1^2)=$ 0,991			$S(x_2^2)=$ 2,622		
<u>$CI\bar{x}_1 = 0,363$</u>			<u>$CI\bar{x}_2 = 0,594$</u>		
Versuchsserie 3			Versuchsserie 4		
Nr.	$CI_3=x_3$	x_3^2	Nr.	$CI_4=x_4$	x_4^2
1	0,814	0,663	1	0,485	0,235
2	0,669	0,448	2	0,342	0,117
3	0,421	0,177	3	0,628	0,394
4	0,279	0,078	4	0,576	0,332
5	0,647	0,419	5	0,482	0,232
6	0,720	0,518	6	0,730	0,533
7	0,483	0,233	7	0,468	0,219
N=7 $S(x_3)=$ 4,033			N=7 $S(x_4)=$ 3,711		
$S(x_3^2)=$ 2,536			$S(x_4^2)=$ 2,062		
<u>$CI\bar{x}_3 = 0,576$</u>			<u>$CI\bar{x}_4 = 0,530$</u>		

Division der CI - Mittelwert - Differenzen durch die Standardabweichung der Mittelwert - Differenz nach der Formel:

$$t_D = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_D} \quad \text{bzw.} \quad \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_3}{s_D} \quad \text{bzw.} \quad \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_3}{s_D}$$

Es ergaben sich folgende Rechnungen:

a) Gegenüberstellung von Versuchsserie 1 und Versuchsserie 2.

$$\text{Mittelwerte } CI\bar{x}_1 = 0,363 \quad CI\bar{x}_2 = 0,594$$

Gemeinsame Streuung (die Formel ist für alle 3 Rechnungen die gleiche).

$$\begin{aligned} s^2_{x_1, x_2} &= \frac{S(x_1^2) - \bar{x}_1 S(x_1) + S(x_2^2) - \bar{x}_2 S(x_2)}{N_1 + N_2 - 2} \\ &= \frac{0,991 - (0,363 \cdot 2,539) + 2,622 - (0,594 \cdot 4,157)}{7 + 7 - 2} \\ &= \frac{0,991 - 0,922 + 2,622 - 2,479}{12} \\ &= \frac{0,069 + 0,143}{12} = \frac{0,212}{12} = 0,0176 \end{aligned}$$

Standardabweichung der Mittelwertdifferenz

$$\begin{aligned} s_D &= \sqrt{\frac{s^2_{x_1, x_2}}{N_1} + \frac{s^2_{x_1, x_2}}{N_2}} = s_{x_1, x_2} \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}} \\ &= \sqrt{0,0176} \cdot \sqrt{\frac{14}{49}} \\ &= 0,132 \cdot 0,535 = 0,071 \end{aligned}$$

Abb. 2 a - b

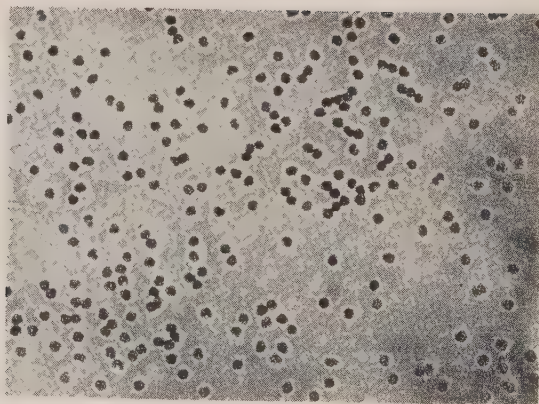
Vers.Reihe Nr. 30

Zellabsiedelungen
eines Pneumolysen-
punktates.

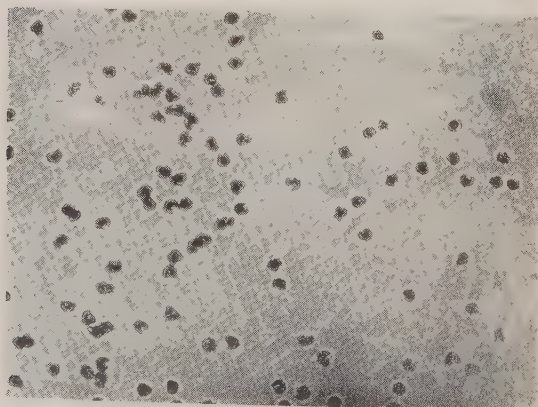
a) Tyrodekontrolle

b) Nach Einwirkung
einer Tuberkulin-
lösung AT 1:2000
Einwirkungsdauer
15 min

a)



b)



$$\begin{aligned} \text{Abweichungsdifferenz } t_D &= \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{s_D} \\ &= \frac{0,363 - 0,594}{0,071} = \frac{0,231}{0,071} = - 3,253 \end{aligned}$$

Für $t = 3,253$ liegt die Wahrscheinlichkeit P bei Freiheitsgrad $n = 12$ zwischen $0,01$ und $0,001$.

Da P kleiner als $0,05$ ist, darf aus diesem Testergebnis der Schluß gezogen werden, daß zwischen den Mittelwerten der Grundgesamtheiten, denen die beiden verglichenen Stichprobenwerte entnommen sind, ein wesentlicher Unterschied besteht. D.h. die Wirkung der beiden Tuberkulin-Lösungen $500 : 1$ und $1000 : 1$ unterscheiden sich signifikant von einander in Bezug auf ihre cytolytische Kraft.

b) Gegenüberstellung von Versuchsserie 1 und Versuchsserie 3.

Mittelwerte $CI\bar{x}_1 = 0,363$, $CI\bar{x}_3 = 0,576$

Gemeinsame Streuung (Formel s. unter a)

$$\begin{aligned} s_{x1,x3}^2 &= \frac{0,991 - (0,363 \cdot 2,539) + 2,536 - (0,576 \cdot 4,033)}{7 + 7 - 2} \\ &= \frac{0,991 - 0,922 + 2,536 - 2,323}{12} \\ &= \frac{0,069 + 0,213}{12} \\ &= \frac{0,282}{12} = 0,0235 \end{aligned}$$

Standardabweichung der Mittelwertdifferenz

$$s_D = \sqrt{0,0235} \cdot \sqrt{0,286} = 0,153 \cdot 0,535 = 0,082$$

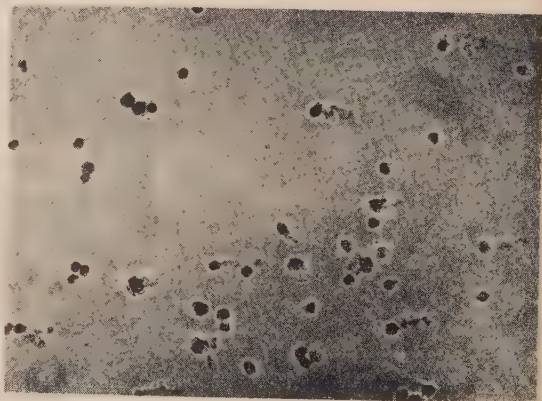
Abb. 3 a - c

Vers.Reihe Nr. 34

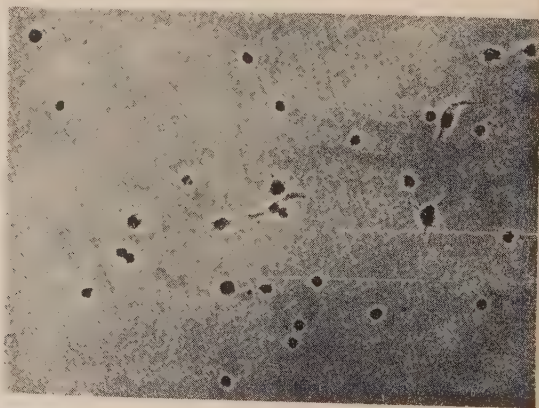
Zellabsiedelungen
eines Pneumolysen-
punktates.

- a) Leerkontrolle
- b) Tyrode-Kontrolle
- c) nach Einwirkung
einer Tuberkulin-
lösung AT 1:500
Einwirkungsdauer
10 min

a)



b)



c)



Abweichungsdifferenz

$$t_D = \frac{0,363 - 0,576}{0,082}$$

$$= \frac{-0,213}{0,082} = -2,572$$

Für $t = 2,572$ liegt die Wahrscheinlichkeit P bei Freiheitsgrad $n = 12$ zwischen $0,05$ und $0,02$.

Auch hier darf, da P kleiner als $0,05$ ist, daraus der Schluß gezogen werden, daß ein signifikanter Unterschied in der cytolytischen Kraft einer Tuberkulin - Lösung von $500:1$ gegenüber einer solchen von $2000:1$ besteht.

c) Es war nun noch zu prüfen, ob auch der Unterschied zwischen der cytolytischen Wirkung einer Tuberkulin-Lösung von $1000:1$ und einer solchen von $2000:1$ signifikant ist. Dazu waren die Stichproben aus Versuchsserie 2 und 3 miteinander zu vergleichen.

$$\text{Mittelwerte } \overline{CI\bar{x}}_2 = 0,594 \quad \overline{CI\bar{x}}_3 = 0,579$$

Gemeinsame Streuung (Formel s. unter a)

$$s^2_{x_2, x_3} = \frac{2,622 - (0,594 \cdot 4,157) + 2,536 - (0,576 \cdot 4,033)}{7 + 7 - 2}$$

$$= \frac{2,622 - 2,479 + 2,536 - 2,323}{12}$$

$$= \frac{0,143 + 0,213}{12}$$

$$= \frac{0,356}{12} = 0,0296$$

Standardabweichung der Mittelwertdifferenz

$$s_D = \sqrt{0,0296} \cdot \sqrt{0,286}$$

$$= 0,172 \cdot 0,535 = 0,092$$

Abweichdifferenz

$$t_D = \frac{0,594 - 0,576}{0,092}$$

$$= \frac{0,018}{0,092} = 0,196$$

Abb. 4 a - c

Vers.Reihe Nr. 29

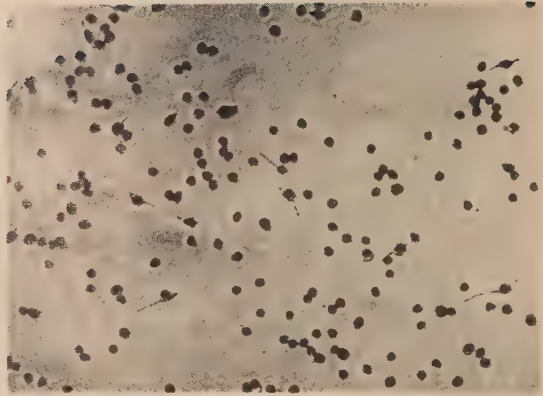
Zellabsiedelungen
eines Pneumolysen-
punktates

a) Leerkontrolle

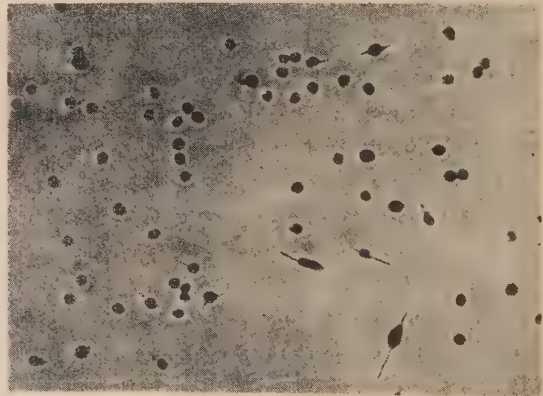
b) Tyrode-Kontrolle

c) nach Einwirkung
einer Tuberkulin-
lösung AT 1:1000
Einwirkungsdauer
10 min

a)



b)



c)



Für $t = 0,196$ liegt die Wahrscheinlichkeit P bei Freiheitsgrad $n = 12$ zwischen $0,90$ und $0,80$.

Hier ist die Wahrscheinlichkeitsgröße P wesentlich größer als $0,05$, so daß man daraus folgern kann, daß die Differenz der Mittelwerte gleich Null ist und die **beiden** Stichprobenmittelwerte lediglich eine Zufallsabweichung darstellen. Das bedeutet in diesem Versuch, daß zwischen der cytolytischen Wirkung einer Tuberkulin - Lösung von $1 : 1000$ und einer solchen von $1 : 2000$ ein "Nichtunterschied" bzw. eine weitgehende Übereinstimmung des cytolytischen Effektes besteht.

Aus den Ergebnissen dieser Prüfungen läßt sich folgern, daß ein signifikanter Unterschied in der Cytolyse-Wirkung verschieden konzentrierter Tuberkulinlösungen besteht. Konzentrierte Tuberkulinlösungen üben einen größeren cytolytischen Effekt auf sensibilisierte Zellen aus als verdünnte. Diese Wirkung scheint mit zunehmender Verdünnung abzunehmen, so daß sie sich bei einer Verdünnung von $2000 : 1$ nicht mehr signifikant von einer Verdünnung von $1000 : 1$ unterscheidet. Es ist möglich, aber nicht bewiesen, daß auch bei hohen Verdünnungen minimale Effekte erhalten bleiben, die, natürlich abhängig vom Sensibilisierungsgrad der Zellen, in diesen Verdünnungen nicht mehr beobachtet werden können.

4. Hinsichtlich der viel diskutierten Frage, ob Zellgebundenheit der Tuberkulinempfindlichkeit nur bei bestimmten Zellarten oder Zellsystemen vorliegt, habe ich die zuvor beschriebenen Ergebnisse (Tuberkulincytolyse an mesenchymalen Wanderzellen) mit denen an lebenden Blutleukocyten unter sonst gleichen Versuchsbedingungen verglichen. Als Stichprobewerte dienten die CIs aus Versuchsserie 2 und Versuchsserie 4. Die Prüfung erfolgte, wie im vorigen Abschnitt beschrieben, durch die Prüfung auf Signifikanz der Differenz zweier Mittelwerte.

Aus 7 Stichproben von Blutleukocyten - Präparaten, auf die eine Tuberkulinlösung von 1 : 1000 eingewirkt hatte und den entsprechenden Stichproben der Extravasat - Präparationen wurden die CI - Mittelwerte errechnet. (s. Tabelle 3). Die Abweichungs - Differenz t_D ergibt sich nach folgender Berechnung:

$$\text{Mittelwerte } CI\bar{x}_2 = 0,594 \quad CI\bar{x}_4 = 0,530$$

Gemeinsame Streuung (Formel wie bei a)

$$\begin{aligned} s^2_{x_2, x_4} &= \frac{2,622 - (0,594 \cdot 4,157) + 2,062 - (0,530 \cdot 3,711)}{7 + 7 - 2} \\ &= \frac{2,622 - 2,479 + 2,062 - 1,967}{12} \\ &= \frac{0,143 + 0,095}{12} \\ &= \frac{0,238}{12} = 0,0181 \end{aligned}$$

Standard - Abweichung der Mittelwert - Differenz

$$\begin{aligned} s_D &= \sqrt{0,0181} \cdot \sqrt{0,286} \\ &= 0,135 \cdot 0,535 = 0,072 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Abweichungs - Differenz } t_D &= \frac{0,594 - 0,530}{0,072} \\ &= \frac{0,064}{0,072} = 0,888 \end{aligned}$$

Für $t = 0,888$ liegt die Wahrscheinlichkeit P bei dem Freiheitsgrad $n = 12$ um 0,40.

Diese Wahrscheinlichkeitsgröße besagt, daß ein "Nicht-unterschied" bzw. eine Übereinstimmung der CI besteht. Eine Tuberkulinlösung von 1000 : 1 hat auf sensibilisierte Blutleukocyten die gleiche cytolytische Wirkung

Table 4

Gegenüberstellung der CI-Mittelwerte, unterteilt nach der Einwirkungs-
dauer und Konzentration der Tuierkulin-Lösungen. (Extravasatpräparationen)

Einwirkungsdauer	5 min			10 min		15 min			20 min und länger		
	500:1	1000:1	500:1	1000:1	2000:1	500:1	1000:1	2000:1	500:1	1000:1	2000:1
Tuberkulinkonz.	500:1	1000:1	500:1	1000:1	2000:1	500:1	1000:1	2000:1	500:1	1000:1	2000:1
Umfang d. Vers. Reihen	5	1	4	9	1	2	3	4	1	5	2
CI-Mittelwerte	0,547	0,627	0,518	0,522	0,375	0,666	0,591	0,611	0,483	0,258	0,299

wie auf mesenchymale Wanderzellen. Man kann daraus schließen, daß alle Zellen mesenchymaler Herkunft in gleicher Weise der Tuberkulinallergie unterliegen, sofern sie einem sensibilisierten Organismus entstammen.

5. Es ist zu erwarten, daß die Tuberkulincytolyse nicht nur von der Konzentration einer Tuberkulinlösung abhängig ist, sondern auch von der Dauer der Einwirkung derselben auf die lebende Zelle.

Während andere Untersucher eine Cytolyse erst nach einer oder mehreren Stunden Einwirkung auf das Zellmaterial beschrieben haben, konnte ich bei meinen Versuchen einen cytolytischen Effekt bereits nach wesentlich geringerer Einwirkungsdauer beobachten. Ich ließ die Tuberkulinlösungen nur 5 bis maximal 40 min auf die Zellen einwirken.

Da sich bei einer klassenunterteilung der Versuchsserien nach Einwirkungsdauer und Konzentration der Tuberkulinlösungen nur sehr ungleiche und zahlenmäßig geringe Stichproben ergeben (Tabelle 4), mußte ich auf eine statistische Sicherung dieser Werte verzichten. Derartig kleine Probekollektive besitzen keinen verbindlichen Aussagewert, weil sie die Grundgesamtheit nicht mehr repräsentieren.

Trotzdessen lassen die errechneten Cytolyse - Indizes erkennen, daß auch nach dieser geringen Einwirkungsdauer eine cytolytische Wirkung eingetreten ist.

Die Ergebnisse berechtigen zu der Annahme, daß die Tuberkulincytolyse der sensibilisierten Zellen unmittelbar nach Zusammentreffen des Tuberkulin mit der Zelle einsetzt. Ohne eine statistische Sicherung dieser Versuchsergebnisse läßt sich jedoch eine gesetzmäßige Beziehung der Abhängigkeit der Cytolyse von der Dauer der Einwirkung nicht sicher behaupten.

7. Schlußfolgerungen.

1. Durch die beschriebenen Versuche konnte gezeigt und durch statistische Sicherung belegt werden, daß eine neutrale Tyrode - Lösung auf tuberkulosesensibilisierte Zellen keine eigene Cytolyse - Wirkung entfaltet. Diese Beobachtung war insofern von Bedeutung, als in den weiteren Versuchen Tyrode - Lösung als Verdünnungsmittel für die Tuberkulin - Lösungen benutzt wurde.

2. Die Beobachtung früherer Untersucher, daß Tuberkulin auf sensibilisierte Zellen mesenchymaler Herkunft cytolytisch wirksam ist, konnte bestätigt und erneut bewiesen werden. Zellabsielungen, die unter sorgfältigster Vermeidung präparativer Artefakte gewonnen wurden, zeigten auf die Einwirkung einer in Tyrode verdünnten Tuberkulin - Lösung gegenüber Leerkontrollen und erweiterten Kontrollen mit neutraler Tyrode -Lösung eine deutliche Cytolyse. Diese konnte auf Grund der Versuchsansätze als spezifische Tuberkulinwirkung herausgestellt werden. Gegenüber den unter identischen Bedingungen hergestellten Kontroll - Präparaten ließ sich der Cytolyse - Effekt im Mikr^ooskop erkennen, arithmetisch durch den Cytolyse-Index ausdrücken und statistisch sichern.

3. Durch statistische Sicherung konnte weiter nachgewiesen werden, daß zwischen der Konzentration einer Tuberkulin - Lösung, die auf sensibilisierte Zellen einwirkt und dem Cytolyse - Effekt eine Abhängigkeit besteht. Es kann angenommen werden, daß geringere Verdünnungen eine größere cytolytische Wirkung besitzen als stärkere Verdünnungen. Die Wirkung nimmt mit zunehmender Verdünnung ab und scheint sich einem minimalen Wirkungsgrad zu nähern, der wahrscheinlich vom Sensibilisierungsgrad der Zellen abhängig ist.

4. Durch statistische Prüfungen konnte ferner gesichert werden, daß sensibilisierte mesenchymale Wanderzellen

in gleichem Maße der Tuberkulin - Cytolyse unterliegen wie Blutleukocyten unter identischen Versuchsbedingungen. Dadurch wird die von anderer Seite bereits beschriebene Beobachtung bestätigt, daß die Tuberkulin - Allergie bei allen Zellen mesenchymaler Herkunft in gleicher Weise wirksam ist.

5. Es konnte gezeigt werden, daß die Cytolyse bereits wenige Minuten nach Einwirkung des Tuberkulin auf die sensibilisierten Zellen eintritt. Eine statistische Sicherung der Abhängigkeit des Cytolyse - Grades von der Dauer der Tuberkulin - Einwirkung war wegen des zu geringen Umfanges der in Klassen einzuteilenden Versuchsserien nicht möglich.

Eine deutliche Cytolyse trat bereits nach 5 Minuten Einwirkungsdauer auf.

8. Zusammenfassung.

Im Rahmen einer historischen und methodologischen Übersicht werden Probleme und wissenschaftliche Erkenntnisse der Tuberkulin - Allergie besprochen. Verschiedene Methoden zur Gewinnung von Zellabsiedelungen erfahren an Hand umfangreicher Vorversuche eine Überprüfung auf ihre Brauchbarkeit für den Tuberkulin - Cytolyse - Nachweis. Besondere Bedeutung wird der Vermeidung präparativer Artefakte beigemessen. Als weiteres geeignetes Material für den Nachweis der Tuberkulinwirkung auf sensibilisierte Mesenchymzellen finden Extravasate aus Pneumolysenhöhlen und Pleuraergüssen in 37 Versuchsreihen Verwendung. An diesem Versuchsmaterial und einigen Versuchsreihen mit Venenblut wird die Tuberkulincytolyse mit verschiedenen starken Tuberkulin - Tyrode - Lösungen nachgewiesen. Reine Tyrodelösung erweist sich als nicht cytolytisch wirksam. Der Cytolyse - Effekt der Tuberkulinlösungen läßt sich gegenüber Leerkontrollen und erweiterten Kontrollen mit Tyrodelösung arithmetisch ausdrücken und statistisch sichern.

Durch verschiedene statistische Prüfungen wird die Abhängigkeit der Tuberkulin -Cytolyse von Konzentration und Einwirkungsdauer der Tuberkulinlösungen nachgewiesen. Die Ergebnisse werden diskutiert und in Schlußfolgerungen zusammengefaßt.

Meinen besonderen Dank möchte ich dem hochverehrten Herrn

PROFESSOR DR. DR. HERMANN E Y E R

Direktor des Max v. Pettenkofer - Institutes, München,
für die Übernahme des Referates,

sowie meinem verehrten Lehrer, Herrn

OMR DR. F.J. B A S S E R M A N N

Chefarzt der Heilstätte Donaustauf,
für die Überlassung des Themas und die wertvollen Anregungen bei der experimentellen Bearbeitung aussprechen.

L i t e r a t u r n a c h w e i s .

A r o n s o n , J.D.: The specific cytotoxic action of tuberculin in tissue culture.

J. Exper. Med. 54, 387 (1931)

B a i l , O.: Weitere Versuche betreffend die Übertragung der Tuberkuloseempfindlichkeit.

Zschr. Immunit. forsch. 12, 451 (1912)

B a l d w i n , E.R.: Studies in immunity to tuberculosis. Hypersusceptibility or anaphylaxis.

J. Med. Res. 22, 189 (1910)

B a s s e r m a n n , F.J.: Elektronenoptische Untersuchungen zur experimentellen Tuberkelbacillen-Phagocytose.

Beitr. Klin. Tbk. 112, 162 - 179 (1954)

dsib.: Vergleichende licht - und elektronenoptische Untersuchungen zur experimentellen Tuberkulinleukolyse.

Beitr. Klin. Tbk. 112, 409 - 418 (1954)

B e r d e l , W. und E. B u d d e c k e: Die allergische Stufenreaktion im tuberkulösen Organismus.

Beitr. Klin. Tbk. 104, 214 - 240 (1950)

B e r d e l , W., O. R u b n e r und G. W i e d e m a n n
Experimenteller Nachweis eines zweiten humoralen antitoxischen Antikörpers bei der Tuberkulinallergie.

Tbk.arzt 9, 534 - 545 (1954)

B l o c h , H. und S u t e r , E: Experimentelle
Immunbiologie der Tuberkulose. In Handbuch der Tbk.
Bd. I, 175 - 222 Stuttgart : Georg Thieme (1958)

C h a s e , M.W. : The cellular transfer of cutaneous
hypersensitivity to tuberculin.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 59, 134 (1945)

C o l e , L.R. und C.B. F a v o u r :
Correlations between plasma protein fractions,
antibody titers and the passiv transfer of delayed
cutaneous reactivity of tuberculin, PPD, and tuber-
culopolysaccharides.
J. Exper. Med. 101, 391 - 420 (1955)

C u m m i n g s , M.M., H o y t , M. und G o t t -
s c h a l l , R.J.: Passive transfer of tuberculin
sensitivity in the guinea pig.
Publ. Health. Rep. 62, 994 (1947)

C u m m i n g s , M.M., R.A. P a t n o d e und P.C.
H u d g i n s : Passive transfer of tuberculin hyper-
sensitivity in guinea pigs using cells disrupted by
sonic vibration.
Amer. Rev. Tbc. 73, 246 - 250 (1956)

D i e n e s , L. und S c h o e n h e i t , E.W. :
Local hypersensitiveness.
J. Immunol. 14, 9, (1927)

D i t t m a r , C. und S i x e l , J.: Untersuchungen über
die Tuberkulinallergie mit Gewebekulturen.
Beitr. Klin. Tbk. 112, 483 - 494 (1954)

E h r e n k r a n z u n d W a k s m a n n : zit. n. H.
Bloch und E. Suter (1958)

F a ß b e n d e r , H.G.: Morphologie der Tuberkulose-
allergie. In Handb. d. Tbk. Bd. I, 223 - 272
Stuttgart: Georg Thieme (1958)

F a v o u r , C.B.: Lytic effect of bacterial products
on lymphocytes of tuberculous animals.
Proc. Soc. Exper. Biol.Med. 65,269 (1947)

d e r s e l b e : In vitro effect of tuberculin on cells.
In Fortschr. Tbk.forsch. 219 - 235
Bibliotheca tuberculosa
Basel und New York : S. Karger (1951)

H a n k s , J.H. : The mechanism of tuberculin hypersen-
sitiveness, the role of the tubercle and of the inflam-
matory reaction of the early tuberculous lesion in the
production of tuberculin hypersensitiveness as determined
by inducing the " tuberculin type " of hypersensitive-
ness with egg white or horse serum.
J. Immunol. 28, 105, (1935)

H e i l m a n n , D.H., W.H. F e l d m a n n u n d
F.C. M a n n : Specific cytotoxic action of tuberculin:
Quantitative studies on tissue culture.
Amer. Rev. Tbc. 50, 344, (1944)

H e i l m a n n , D.H. und F.B. S e i b e r t :
The effect of purified fractions of tuberculin on
tuberculin-sensitive tissue.
Amer. Rev. Tbc. 53, 71 (1946)

H e i l m e y e r , L. : Blut und Blutkrankheiten.
In Handb. Inn.Med. Berlin: Springer (1951)

H e n s e l , G.: Experimenteller Beitrag zur Frage
der transitorischen Tuberkulinallergie.
Tbk.arzt 6, 717 - 720 (1952)

H o l s t , M. : Studies on the effect of tuberculin.
Tubercle 3 249, 289, 337 (1922)

H o s e m a n n , H. : Grundlagen der statistischen
Methoden für Mediziner und Biologen.
Stuttgart: G. Thieme (1949)

K i r c h h e i m e r , W.F. , R.S. W e i s s e r
und W. v a n L i e w : The tuberculin reaction:
Transfer of systemic tuberculin sensitivity with
cells of tuberculous guinea pigs.
Proc. Soc. Exper. Biol.Med. 71, 516 (1949)

K l e i n s c h m i d t , H.: Tuberkulin und Tuber-
kulinempfindlichkeit.
In Handb. d. Tbk. Bd. I, 351 - 392
Stuttgart: G. Thieme (1958)

K o c h , R. : Fortsetzung der Mitteilungen über
ein Heilmittel gegen Tuberkulose.
Dtsch. med. Wschr. 17, 101, 1189 (1891)

d e r s e l b e : Über neue Tuberkulinpräparate.
Dtsch. med. Wschr. 23, 209 - 213 (1897)

L a n d s t e i n e r , K. und C h a s e , M.W. :
Experiments on transfer of cutaneous sensitivity
to simple compounds.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 49, 688 (1942)

L a n g n e r , K. : Spezifische Antigenaktionen
an Leukocyten bei Tuberkulösen.
Klin. Wschr. 1950, 177 - 179.

Lawrence, H.S. : The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man.

Proc.Soc.Exper. Biol.Med. 71, 516 (1949)

derselbe : Transfer of generalized cutaneous hypersensitivity of the tuberculin type in man by means of constituents of disrupted leucocytes.

J. Clin. Invest. 33, 951 (1954)

Laves, W. : ÜberFaktoren der Leukocytolyse.

Schweiz. med.Wschr. 39, 1097 - 1100 (1954)

Metaxas, M.N. und M. Metaxas - Bühler : Passive transfer of local cutaneous hypersensitivity to tuberculin.

Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 69, 163 (1948)

Miller, J.M., C.B. Favour, B.A. Wilson und M.A. Umbarger : A plasma factor responsible for in vitro lysis of leucocytes by tuberculoprotein.

Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 70, 738 (1949)

Miller, J.M., J.H. Vaughan und C. B. Favour : The role of a complement in the lysis of leucocytes by tuberculoprotein.

Proc. Soc. Exper. Biol Med. 71, 592 (1949)

Miller, J.M. und C.B. Favour : The lymphocytic origin of plasma factor responsible for hypersensitivity in vitro of tuberculin type.

J. Exper. Med. 93, 1 - 12 (1951)

Moen, J.K. und M.F. Swift : Tissue culture studies on bacterial hypersensitivity.

J. Exper. Med. 64, 339 (1936)

P i r q u e t , CI (1906) zit. n. Faßbender, H.G. (1958)

R i c h , A.R. und M.R. L e w i s : The nature of allergy in tuberculosis as revealed by tissue culture studies.

Bull. Johns Hopkins Hosp. 50, 115 (1932)

R ö s s l e , E.R. (1932) zit. n. Faßbender, H.G. (1958)

R u b n e r , O. und B u d d e c k e , E. :

Kritische Betrachtungen der verschiedenen Anschauungen über die Beziehungen zwischen Allergie und Immunität bei der Tuberkulose.

Beitr. Klin. Tbk. 116, 355 - 375 (1957)

S c h l a n g e , H. : Die passive Übertragung der Tuberkulinhautempfindlichkeit durch Blutaustauschtransfusionen und die Übertragbarkeit erworbener Tuberkulin-negativität.

Arch. Kinderhk. 12 - 22, 148 (1954)

d e r s e l b e : Die Übertragbarkeit der Tuberkulinempfindlichkeit von Kindern auf Meerschweinchen durch Cantharidinblasensedimente.

Zschr. Kinderhk. 76, 39 - 47 (1955)

S c h m i d , F. : Die passive Übertragbarkeit der Tuberkulinallergie.

Beitr. Klin. Tbk. 105, 397 - 402 (1951)

d e r s e l b e : Übertragung der Tuberkulinallergie mit Liquorzellen.

Tbk.arzt 5, 701 - 704 (1951)

d e r s e l b e : Die Tuberkulincytolyse.

Beitr. Klin. Tbk. 109, 151 - 162 (1953)

d e r s e l b e : Immunbiologie.

In Handb. d. Tbk. Bd. I, 291 - 350.

Stuttgart: Georg Thieme (1958)

S c h m i d t - R o h r , H. und T. W i n n e w i s s e r :
Über die Haltbarkeit von länger, unter verschiedenen Be-
dingungen aufbewahrten Tuberkulinverdünnungen.

Münch. med. Wsch. 6, 190 - 193 (1956)

S e i b e r t , F.B.:zit. n. C.B. F a v o u r (1951)

S t a v i t s k y , A.B. : Passive cellular transfer
of the tuberculin type of hypersensitivity.

Proc. Soc. Exper. Biol.Med. 67, 225 (1948)

U n d r i t z , E.: Über das Vorkommen von Abbauförmn
der Leukocyten im Blut.

Fol. Haemat. 65, 195 - 202 (1941)

Wissenschaftliche Tabellen

Basel: Geigy - A.G. (1955)

W i t t e , S. : Morphologische und serologische
Studien über Tuberkulinwirkungen an Leukocyten
in vitro.

Beitr. Klin. Tbk. 104, 252 - 259 (1950)

Z i n s s e r , H. : Studies on the tuberculin reaction
and on specific hypersensitiveness in bacterial infection.

J. Exper. Med. 34, 495 (1921)

L e b e n s l a u f

Am 10. Juni 1921 wurde ich als Sohn des Elektromeisters Alfred Steinig und dessen Ehefrau Agnes, geb. Stoeber, in Breslau geboren. Nach vierjähriger Volksschulzeit besuchte ich die Eichendorff - Oberrealschule in Breslau.

Dort legte ich 1939 die Reifeprüfung ab, leistete anschließend die Arbeitsdienstpflicht und wurde im Oktober 1939 zum Studium entlassen. An der Schlesischen Friedrich - Wilhelms - Universität in Breslau begann ich mein Medizinstudium. Nach bestandenem Physikum wurde ich im Januar 1941 zur Wehrmacht eingezogen. Nach Kriegseinsatz in Frankreich und an der Ostfront setzte ich im November 1942 als Wehrmachtsangehöriger mein klinisches Studium in Breslau fort. Im Januar 1945 wurde ich nach Würzburg abgeordnet. Nach dem neunten Semester kam ich in amerikanische Gefangenschaft. Im Januar 1946 erfolgte meine Entlassung. Erst im Sommersemester 1946 konnte ich mein Studium an der Universität München beenden und legte dort im Februar 1947 mein Staatsexamen ab.

Am Kreiskrankenhaus Cham war ich bis Juli 1950 als Pflicht- und Volontärassistent tätig und anschließend zwei Jahre Praxisvertreter.

Seit Juli 1952 bin ich bei der Landesversicherungsanstalt Niederbayern-Oberpfalz, Landshut, als Arzt tätig. Bis Oktober 1954 war ich zunächst vertretungsweise als Vertrauensarzt und Gutachter, danach als Assistenzarzt in der Heilstätte Donaustauf eingesetzt. Am 1. April 1958 erhielt ich die Anerkennung als Lungenfacharzt durch die Bayer. Landesärztekammer.

Seit April 1958 bin ich im Medizinalreferat der IVA Landshut als Prüfarzt beschäftigt.

